



Carolina Henriques Bernardino Marchante

Licenciada em Química Aplicada

**Membranas de fibras contendo
solventes eutéticos para absorção de
CO₂**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Prof. Doutor João Paulo Borges, Professor
Auxiliar, FCT-UNL

Co-orientadora: Doutora Rita Craveiro, Investigadora Pós-
Doc, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares

Arguente(s): Doutora Luísa Alexandra Graça Neves

Vogal(ais): Doutora Rita Paula Paiva Craveiro



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março de 2018

Carolina Henriques Bernardino Marchante

Licenciada em Química Aplicada

Membranas de fibras contendo solventes eutéticos para absorção de CO₂

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Prof. Doutor João Paulo Borges, Professor Auxiliar, FCT-UNL

Co-orientador: Doutora Rita Craveiro, Investigadora Pós-Doc, FCT-UNL

Março de 2018

Fiber membranes based on deep eutectic solvents for CO₂ absorption

“Copyright” Carolina Henriques Bernardino Marchante, FCT/UNL e da UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

However difficult life may seem, there is always something you can do, and succeed at. It matters that you don't just give up.

- Stephen Hawking

Agradecimentos

A caminhada até chegar aqui foi longa e com bastantes percalços, mas sem o apoio e ajuda de muitas pessoas que estiveram presentes ao longo deste ano e dos restantes anos académicos não seria possível chegar até aqui. Posto isto, quero deixar um agradecimento geral para todas estas pessoas que contribuíram para que a concretização desta tese fosse possível.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Professor João Paulo Borges pela orientação e inserção no laboratório de Biomateriais. Agradeço-lhe o tempo que disponibilizou para esclarecimento de dúvidas e reuniões para perceber o *electrospinning* e comportamento das fibras, assim como novas ideias e soluções para o desenvolvimento deste projeto. À Professora Susana Barreiros, obrigada por me ter aceite no seu laboratório, pela disponibilidade, ensinamentos e ideias de poder chegar aos objetivos finais. Ao Alexandre Paiva, quero agradecer por todas as sugestões, discussões de resultados e toda a disponibilidade e interesse demonstrados para chegar ao resultado final.

À Rita Craveiro, sem ela nada disto seria possível. Um muito obrigado pela orientação e apoio ao longo de todo o processo, por estar sempre disponível para qualquer dúvida que eu tinha ou para ajudar em qualquer coisa que aparecesse, tanto na escrita, como no laboratório ou nos resultados. Para além de toda a ajuda que foi fundamental para este trabalho, agradeço toda a simpatia e carinho sempre demonstrou em situações fora da área de trabalho.

Não esquecendo dos restantes residentes do laboratório 427 que foram também importantes. Ao Bruno, à Francisca, à Liane e à Mónica, um obrigada por me receberem no laboratório, por esclarecerem dúvidas, localizarem onde material estava no laboratório e tornarem o laboratório um local mais alegre e familiar.

À Ana Sofia. Minha companheira de todas as horas, da licenciatura ao mestrado e até na tese juntas! Um obrigada não chega para te agradecer. Tudo o que já passámos juntas, desde de um *peddy-paper* pela FCT até às horas infernais no *electrospinning* já aturaste muitos dos meus dilemas e dos meus choros, já me disseste mil e uma palavras de apoio e de motivação que dava para escrever toda uma tese por tudo o que partilhámos até hoje.

Obrigada por seres quem és e por estares sempre presente em qualquer ocasião para dar aquela palavrinha essencial.

Ao Rafael. Quem diria que três meses chegavam para criar um carinho tão especial e uma amizade por um “cara” de Atibaia. Horas de desespero no *electrospinning* partilhadas, e não só, deram-me a conhecer um rapaz super “legáu” que sempre deu uma força enorme e que acreditou que “vai dar tudo certo”. Obrigada por tudo, pelas risadas, apoio, carinho, simpatia e por animares qualquer lugar.

Às amigas de longa data. Obrigada por acreditarem que eu era capaz e por me darem sempre motivação para continuar. Animaram dias mais difíceis e estiveram lá sempre que vos pedi apoio e um abraço.

Ao Alexandre e ao George. De maneira peculiar e bem ou mal, foram fundamentais neste trajeto. Obrigada por estarem lá, para me trazerem à realidade, para me demonstrarem o outro lado das coisas, por me obrigarem a escrever a tese quando na minha cabeça já não dava para mais, pela amizade e pelo carinho.

À Inês Mocho. Um obrigada não é suficiente para te agradecer tudo, por sempre acreditares que eu era capaz e por me fazer pensar positivo. Poder chegar a casa e ter uma amiga com quem contar foi fundamental durante todo este processo.

Aos mais importantes, o meu pai e a minha mãe. Nada disto seria possível sem vocês e só isto não chega para agradecer. Obrigada por me terem dado sempre liberdade de escolha e todo o apoio e amor incondicional, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu avô e à minha avó. Apesar de um de vós já não estar presente, sei que estão orgulhosos pela “doutora” ter chegado até aqui.

Obrigada a todos do fundo do coração por me terem levantado, apoiado e ajudado até aqui. Se me esqueci de mencionar alguém ou de agradecer de uma melhor forma, sabem que expressar o que sinto não é o meu forte, no entanto estarão sempre no meu coração.

Resumo

O trabalho realizado na presente tese, teve como objetivo o desenvolvimento de membranas de fibras com a integração de solventes eutéticos (DES) para captura de CO₂. Os solventes eutéticos têm um excelente potencial como solventes de captura de CO₂, uma vez que exibem propriedades mais convidativas e um baixo preço de produção em relação aos líquidos iônicos e outros solventes. O suporte dos DES em materiais resistentes e a possível reutilização deste solvente, é também uma estratégia válida de desenvolver um sistema de captura/conversão de CO₂. Foram preparados vários DES, tais como cloreto de colina e ureia – ChCl:ureia, razão molar (1:2), e cloreto de colina e glicerol – ChCl:glicerol, razão molar (1:2). Foram também testados diferentes polímeros para a produção de membranas de fibras por *electrospinning*, tais como acetato de celulose e poli(vinil álcool) - PVA. De acordo com a literatura, os DES ChCl:Ureia (1:2) e ChCl:Glicerol (1:2) apresentam valores de solubilidade comparáveis com alguns solventes tradicionalmente utilizados (p.e. aminas). Estes DES foram estudados em maior detalhe, através da viscosidade e FTIR.

Através da técnica de *electrospinning* foi possível a formação de um material tridimensional constituído por fibras de PVA (9 % em água) com percentagens de 0.5 e 2% (v/v) de ChCl:Ureia (1:2) e 2% (v/v) ChCl:Glicerol (1:2). Estas membranas foram caracterizadas por técnicas de FTIR, SEM, XPS e propriedades mecânicas. Para que o processo de captura/transformação de CO₂ se tornasse mais eficiente, foi encapsulada na membrana de fibras uma enzima capaz de acelerar a captura do CO₂, a anidrase carbónica. Verificou-se que a enzima é ativa numa fibra de 9% PVA em água com 0.5% ChCl:Ureia (1:2), provando que esta estratégia de captura/transformação de CO₂ apresenta muito potencial.

Abstract

The work presented in this thesis had the goal to develop fiber membranes integrated with the use of eutectic solvents (DES), for CO₂ capture. Eutectic solvents (DES) have high potential as solvents for CO₂, being excellent alternatives to ionic liquids (ILs) and other solvents, since they have adequate properties and have a very low production cost. The support of DES in resistant materials and possible solvent reutilization, is an achievable strategy for the development of a capture/conversion system. Different DES were prepared such as choline chloride and urea – ChCl:urea, molar ratio (1:2) and choline chloride and glycerol – ChCl:glycerol, molar ratio (1:2). Different polymers were also tested for electrospinning fiber production, such as cellulose acetate and poly (vinil alcohol). According to literature, DES ChCl:urea (1:2) and ChCl:glycerol (1:2) present CO₂ solubility values comparable to the ones obtained in traditionally used solvents (e.g. amines). The prepared DES were studied in more detail and characterized by FTIR and its viscosity was determined.

Using electrospinning, it was possible to obtain a three-dimensional material composed by PVA (9% in water) with different percentages of DES 0.5 and 2% (v/v) of ChCl:urea and 2% (v/v) of ChCl:glycerol (1:2). These fiber membranes were characterized by FTIR, SEM and XPS, and their mechanical properties were assessed.

In order to increase the efficiency of the CO₂ capture/transformation process, an enzyme was also encapsulated in the fiber membrane, carbonic anhydrase, which is able to catalyze CO₂ capture. It was observed that the enzyme exhibits activity when encapsulated in a PVA fiber membrane with 0.5% of ChCl:urea (1:2), proving that this method for CO₂ capture/transformation holds great potential.

Índice de Matérias

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Introdução..... | 1 |
| 1.1 | Química Verde | 1 |
| 1.2 | CO ₂ – Dióxido de Carbono | 2 |
| 1.2.1 | Técnicas de captura de CO ₂ | 4 |
| 1.2.1.1 | Absorção de CO ₂ – Soluções aquosas de alcanolaminas | 4 |
| 1.2.1.2 | Adsorção de CO ₂ | 6 |
| 1.2.1.3 | Membranas para captura de CO ₂ | 6 |
| 1.2.1.4 | Líquidos Iônicos (ILs) | 7 |
| 1.3 | Deep Eutectic Solvents – DES | 11 |
| 1.4 | Enzimas | 14 |
| 1.4.1 | Anidrase carbónica | 14 |
| 1.4.2 | Imobilização de enzimas | 15 |
| 1.5 | <i>Electrospinning</i> (Eletrofiação) | 16 |
| 1.5.1 | Processo de eletrofiação | 17 |
| 1.5.2 | Parâmetros do <i>Electrospinning</i> | 18 |
| 1.5.2.1 | Parâmetros da Solução | 18 |
| 1.5.2.2 | Parâmetros do processo | 19 |
| 1.5.2.3 | Parâmetros ambientais | 20 |
| 1.5.3 | Eletrofiação do PVA (álcool polivinílico) | 20 |
| 2 | Materiais e Métodos | 23 |
| 2.1 | Materiais | 23 |
| 2.1.1 | DES (<i>Deep eutectic solvents</i>) | 23 |
| 2.1.2 | Polímeros e solventes | 23 |
| 2.1.3 | Enzima e solventes | 23 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.2 | Métodos..... | 24 |
| 2.2.1 | Preparação dos DES | 24 |
| 2.2.2 | Preparação das soluções de polímero | 24 |
| 2.2.3 | Solubilidade e preparação dos DES em soluções poliméricas | 25 |
| 2.2.4 | Preparação da solução de PVA com DES e enzima | 26 |
| 2.2.5 | Caracterização Química | 26 |
| 2.2.5.1 | Determinação do conteúdo de Água..... | 26 |
| 2.2.5.2 | Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) | 27 |
| 2.2.6 | Caracterização Morfológica | 28 |
| 2.2.6.1 | Microscopia eletrónica de varrimento (SEM) | 28 |
| 2.2.7 | Caracterização Mecânica | 29 |
| 2.2.7.1 | Testes de tração..... | 29 |
| 2.2.8 | Reologia..... | 30 |
| 2.2.9 | <i>Electrospinning</i> | 31 |
| 2.2.9.1 | Soluções de polímero e polímero/DES para <i>electrospinning</i> | 31 |
| 2.2.9.2 | Montagem de <i>Electrospinning</i> | 32 |
| 2.2.9.3 | Condições de <i>electrospinning</i> | 33 |
| 2.2.10 | Determinação da atividade enzimática da anidrase carbónica..... | 34 |
| 2.2.10.1 | Método de Wilbur-Anderson | 34 |
| 2.2.10.2 | Método colorimétrico | 35 |
| 3 | Resultados e Discussão..... | 37 |
| 3.1 | Propriedades dos DES..... | 37 |
| 3.1.1 | Conteúdo de água presente em DESs | 37 |
| 3.1.2 | Solubilidade DES em soluções de polímero | 38 |
| 3.1.3 | FTIR | 38 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.2 | Reologia de solventes eutéticos e soluções poliméricas..... | 42 |
| 3.3 | <i>Electrospinning</i> | 44 |
| 3.3.1 | Caracterização das Fibras de PVA..... | 48 |
| 3.3.1.1 | FTIR..... | 48 |
| 3.3.1.2 | Ensaio de tração..... | 49 |
| 3.4 | Atividade Enzimática da Anidrase Carbónica | 51 |
| 3.4.1 | Método de Wilbur-Anderson | 51 |
| 3.4.2 | Método colorimétrico – Atividade da esterase | 52 |
| 4 | Conclusão..... | 55 |
| 5 | Trabalho Futuro..... | 57 |
| 6 | Bibliografia | 59 |
| 7 | Anexos | 65 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.1.1 – Os 12 Princípios da Química Verde | 2 |
| Figura 1.2.1 – Técnicas de captura de CO ₂ para as respectivas pós-combustão, pré-combustão e oxcombustível (adaptado de D. Alessandro, 2010) ^[6] | 3 |
| Figura 1.2.2 – Aminas utilizadas em absorção química de CO ₂ | 4 |
| Figura 1.2.3 – Diferentes catiões e aniões que formam os líquidos iônicos. (adaptado M. Hasib-ur-Rahman et al., 2010) ^[34] | 8 |
| Figura 1.2.4 – Aplicações dos Líquidos Iônicos (Adaptado de Pham T. et al, 2010) ^[36] | 8 |
| Figura 1.3.1 – Diagrama de fases de dois componentes com representação do ponto eutético. | 11 |
| Figura 1.3.2 – Exemplos de possíveis halogenetos e HDBs utilizados para a síntese de DES..... | 12 |
| Figura 1.5.1 – Aplicações de fibras obtidas por eletrofiação. ^[65] | 16 |
| Figura 1.5.2 – Esquema de montagem laboratorial típica de <i>electrospinning</i> | 17 |
| Figura 1.5.3 – Estrutura do PVA. (n=nº de repetições do monómero). | 21 |
| Figura 1.5.4 – Imagens de SEM de fibras de soluções de PVA a) 6%, b) 8%, c) 10%, d) 12%. As imagens contornadas a vermelho foram obtidas com um potencial elétrico de 12.5 kV, a verde com 17.5 kV e a azul com 22.5 kV. Todas elas com uma distancia de 15 cm e uma taxa de deposição de 1 mL/h. ^[71] | 22 |
| Figura 2.2.1 – Coulómetro de Karl-Fischer | 27 |
| Figura 2.2.2 – a) Acessório de ATR utilizado no espectrofotómetro; b) Uma célula de ATR. | 28 |
| Figura 2.2.3 – Máquina de tração utilizada nos testes de tração, Rheometric Scientific (Minimat Firmware 3.1). | 30 |
| Figura 2.2.4 – Montagem de <i>electrospinning</i> utilizada sem a fonte de tensão. 1) bomba de infusão; 2) anel condutor; 3) coletor com folha de alumínio; 4) sistema agulha-seringa. | 33 |
| Figura 3.1.1 – Espectros de FTIR do ChCl:Ureia (1:2) e de cada componente que o constitui, a ureia e o cloreto de colina..... | 40 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.1.2 – Espectros de FTIR do ChCl:glicerol (1:2) e de cada componente que o constitui, o glicerol e o cloreto de colina. | 41 |
| Figura 3.2.1 - Curvas de fluxo obtidas para os DES estudados, ChCl:Glicerol (1:2) - x e ChCl:Ureia (1:2) – ●. | 43 |
| Figura 3.2.2 – Curva de fluxo das soluções analisadas. ChCl:U – ChCl:Ureia (1:2); 9PVA_W – 9% PVA em água; 9PVA_0.5CU – 9% PVA em água com 0.5% (v/v) ChCl:Ureia; 9PVA_2CU – 9% PVA em água com 2% (v/v) ChCl:Ureia. | 44 |
| Figura 3.3.1 – Fibras observadas ao microscópio de 12% (w/v) acetato celulose em DMAc:Acetona (70:20). | 44 |
| Figura 3.3.2 – Imagens SEM de uma membrana de fibra obtida por <i>electrospinning</i> de 15% CA em ácido acético:água com 2% ChCl:Ureia, com as condições descritas na Tabela 2.2.9.3 – Condições de <i>electrospinning</i> utilizadas para diferentes soluções., com duas aproximações de zoom diferentes. | 45 |
| Figura 3.3.3 – Membrana de fibra de 9% PVA em H ₂ O, observada em microscópio eletrônico, obtida com as seguintes condições de <i>electrospinning</i> : T _a =24 °C, Humidade=41-43 %, Flow rate=0.2 ml/h, Voltagem= 17.5 kV e distância entre a agulha e o coletor=12 cm | 46 |
| Figura 3.3.4 – Imagens de SEM de duas membranas de fibra obtidas com 9% PVA em água diferindo no DES utilizado. Em (A) foi usado 2% (v/v) ChCl:ureia, enquanto que em (B) foi utilizado 2% (v/v) ChCl:glicerol. | 46 |
| Figura 3.3.5 – Imagem de SEM de uma fibra constituída por 9% (w/v) PVA em água com 0.5% (v/v) ChCl:Ureia. | 47 |
| Figura 3.3.6 – Espectros de FTIR-ATR obtidos pela análise de amostras de fibras de 9 % (w/v) PVA, 9% PVA e 0.5% (v/v) ChCl:Ureia e também com 2% deste mesmo DES. | 49 |
| Figura 3.3.7 – Curvas de tração obtidas para as amostras de fibras 9% (w/v) PVA em água (9PVA) e 9% (w/v) PVA em água com 0.5% (v/v) ChCl:ureia (1:2) (9PVA0.5CU). | 50 |
| Figura 3.4.1 – Atividade enzimática da anidrase carbónica quando livre e quando presente 2% e 0.5% (v/v) de ChCl:Ureia (1:2) dissolvido em tampão Tris-HCl. | 51 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.4.2 – Atividade enzimática da esterase na enzima anidrase carbónica, quando livre numa concentração 0.5 mg/ml e quando imobilizada numa fibra com DES. | 53 |
|--|----|

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1.2.1.1 - Capacidade de CO ₂ de líquidos iônicos com absorção física ^[40] .. | 10 |
| Tabela 2.2.1.1 - Lista de Deep Eutectic Solvents usados no presente estudo, com respectivas razões molares e temperatura de preparação..... | 24 |
| Tabela 2.2.2.1 - Polímeros e respectivos solventes utilizados na preparação das soluções poliméricas, assim como a percentagem em peso/volume, a temperatura de dissolução e o nome atribuído. | 25 |
| Tabela 2.2.3.1 - Condições de preparação das soluções de polímero e DES..... | 26 |
| Tabela 2.2.9.1 – Soluções utilizadas na técnica de <i>electrospinning</i> | 32 |
| Tabela 2.2.9.2 - Solução utilizada na técnica de <i>electrospinning</i> com enzima | 32 |
| Tabela 2.2.9.3 – Condições de <i>electrospinning</i> utilizadas para diferentes soluções. | 34 |
| Tabela 3.1.1.1 - Percentagem de água presente em cada DES, obtidos pelo método de Karl-Fischer..... | 37 |
| Tabela 3.3.1.1 – Resultados obtidos dos ensaios mecânicos realizados com as fibras obtidas. | 50 |

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

CO₂ – Dióxido de Carbono

IPCC - Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas

CCS – Captura e Armazenamento de Carbono

ILs – Líquidos Iônicos

DES – *Deep Eutectic Solvents* (Solventes Eutéticos)

MEA - monoetanolamina

DEA - dietanolamina

MDEA – metildietanolamina

atm – atmosfera (unidade de pressão)

(w/w) – relação peso/peso

(v/v) – relação volume/volume

(w/v) – relação peso/volume

HBD - dador de ligações de hidrogénio

ChCl – cloreto de colina

PVA – poli(vinil álcool)

DMAc - dimetilacetamida

p-NPA - acetato 4-nitrofenil

p-NP – p-nitrofenol

CA – anidrase carbónica

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier

ATR – reflexão total atenuada

SEM - Microscopia eletrónica de varrimento

XPS - Espetroscopia de fotoeletrões de raios-X

ν – Elongação (variação dos comprimentos das ligações)

δ – Deformação (variação dos ângulos das vibrações)

ν_{as} – Elongação assimétrica

v_{as} – Elongação simétrica

δ_s – Deformação simétrica

δ_{as} – Deformação assimétrica

1 INTRODUÇÃO

1.1 Química Verde

O planeta Terra vê-se envolto com o crescimento da poluição ambiental, do ar, da água e dos solos. Esta adversidade é sustentada pelo aquecimento global e por uma crise energética, tornando a vida na Terra mais difícil. O uso de químicos na preparação de vários materiais com diversas aplicações na área da metalúrgica, síntese de químicos e fármacos, utilização de solventes orgânicos voláteis, polímeros, agricultura, detergentes e assim por diante, é uma das causas da poluição de diferentes tipos.^[1]

Nos últimos anos, o controlo e prevenção da poluição tornaram-se uma grande preocupação da comunidade científica, devido a uma maior consciência dos problemas que esta provoca ao ambiente e à saúde dos seres vivos. Sendo o Homem um dos principais consumidores de químicos e sendo a indústria responsável pela emissão de diversos poluentes tornou-se necessário uma abordagem alternativa ao consumo e fabrico de produtos químicos. Em meados dos anos 90 surge um novo conceito, introduzido por Anastas e Warner^[2], com a principal demanda de uma nova realidade de produtos e processos químicos menos tóxicos, chamado de Química Verde.^{[3], [4]} A Agência de Proteção Ambiental define Química Verde como “o design de produtos químicos e processos que reduza ou elimine o uso ou geração de substâncias nocivas”.^[5]

A criação de uma química verde e sustentável guia-se por 12 Princípios (Figura 1.2.1), permitindo assim uma prática química consciente e incentivando formas inovadoras e originais de beneficiar e proteger a população, o ambiente e a economia.^[3]



Figura 1.1.1 – Os 12 Princípios da Química Verde

1.2 CO₂ – Dióxido de Carbono

Um dos maiores problemas atuais da humanidade são as alterações climáticas devidas ao aquecimento global, tendo um impacto em várias áreas da sociedade: económica, social e ambiental. O aumento da concentração de CO₂ na atmosfera é uma das principais causas destas alterações. A atividade humana é a maior geradora de emissões de CO₂, proveniente da queima de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás natural) para produção de energia, indústria, transportes, desflorestação e do processamento químico.^[6]

O efeito de estufa é um processo natural que controla a temperatura do planeta Terra através da absorção de parte da radiação solar refletida pela superfície terrestre por gases de estufa.^[7] O CO₂ é um dos principais gases do efeito de estufa, estando presente na atmosfera como parte do ciclo de carbono na Terra entre a atmosfera, oceanos, solo, plantas e animais.^[8] Com o aumento das emissões de CO₂ para a atmosfera, o efeito de estufa tem-se intensificado, verificando-se transformações no planeta, tais como o aumento da temperatura terrestre e dos oceanos, aumento do nível dos oceanos, diminuição da camada de ozono, aumento de catástrofes naturais e de, fenómenos meteorológicos (cheias, tsunamis, etc.).^[9]

Segundo o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), espera-se que as emissões de CO₂ dupliquem até 2050.^[10] Assim, a redução das emissões e remoção de CO₂ na atmosfera tornaram-se um tópico urgente e atrativo para os cientistas nas últimas décadas como resposta a esta problemática.^[11]

A estratégia de captura e armazenamento de CO₂ (*carbon capture and storage* - CCS) é uma das soluções verosímeis para a redução de emissões de CO₂ antropogénicas.^[12] O IPCC define CCS como um “processo que consiste na separação de CO₂ de fontes industriais e energéticas, transporte para um local de armazenamento e isolamento de longo prazo da atmosfera”.^[13] A CCS complementa outras estratégias, tais como, melhoramento da eficiência energética, utilizando combustíveis com menor intensidade de carbono, como o gás natural e implementação gradual de energias renováveis (por exemplo, energia solar e biomassa).^[6] Para a captura de CO₂ existem três abordagens:

- Captura pós-combustão – captura do CO₂ após a combustão;
- Captura pré-combustão – captura do CO₂ gaseificado proveniente do gás de síntese de carvão, isto é, antes da queima de combustível;
- Processo oxicomcombustível – queima de combustível fóssil através de oxigénio concentrado, gerando CO₂ concentrado e vapor de água.^[14]

Estas apresentam diversas técnicas para captura de CO₂, como se pode observar na Figura 1.2.1.

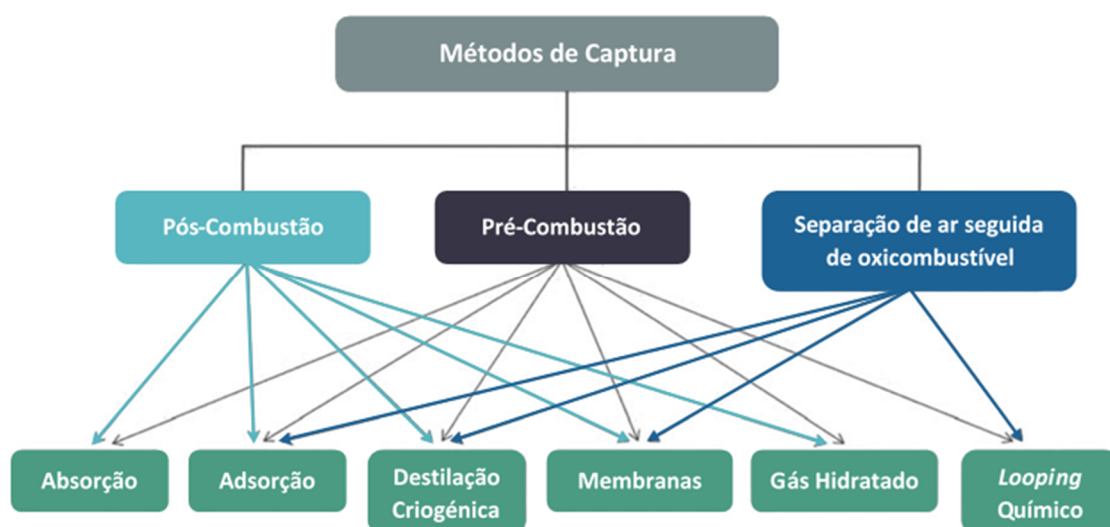


Figura 1.2.1 – Técnicas de captura de CO₂ para as respetivas pós-combustão, pré-combustão e oxicomcombustível (adaptado de D. Alessandro, 2010)^[6]

A captura de CO₂ por pós-combustão, apesar de apresentar limitações como baixa pressão do gás de combustão (ca. 1 atm) e baixa concentração (ca. 15% w/w)^[6], apresenta vantagens em relação às restantes apresentadas, sendo mais fáceis de implementar, apresentando um menor custo.^[13]

1.2.1 Técnicas de captura de CO₂

Apesar de existirem várias técnicas para a captura de dióxido de carbono, este trabalho focar-se-á apenas nas técnicas de absorção, adsorção e membranas, sendo as mais relevantes neste projeto.

1.2.1.1 Absorção de CO₂ – Soluções aquosas de alcanolaminas

Absorção é um processo que pode ser químico ou físico, na qual átomos, moléculas ou iões interagem com um material líquido ou sólido. Este processo é comum na indústria química, e tal como outros é utilizado no tratamento de gases industriais.^[15]

A absorção química resulta da reação do CO₂ com um solvente, formando um composto intermediário de ligação fraca, em que o composto inicial pode ser recuperado através do aquecimento do solvente.^[13]

Atualmente e a nível industrial, as soluções aquosas de alcanolaminas são as mais utilizadas para a absorção de CO₂, pois apresentam os rendimentos mais elevados de absorção.^[16] Neste processo, a solução consegue absorver seletivamente o CO₂ proveniente de gases de combustão, através de um processo de absorção química.^[17] As aminas mais utilizadas neste tipo de absorção são a monoetanolamina (MEA), uma amina primária; dietanolamina (DEA), uma amina secundária e uma amina terciária, a metildietanolamina (MDEA) (Figura 1.2.2), diferindo umas das outras nos grupos orgânicos ligados ao átomo de azoto.

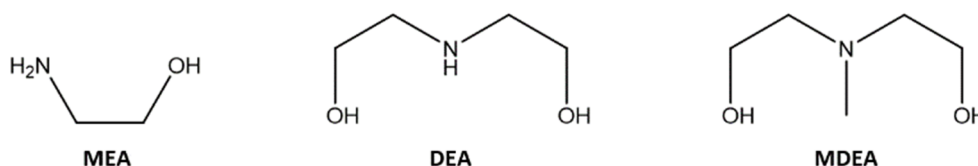
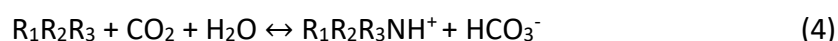


Figura 1.2.2 – Aminas utilizadas em absorção química de CO₂

As aminas primárias/secundárias capturam o CO₂ através da formação de carbamato a baixas temperaturas (aproximadamente 40 °C) e a regeneração do solvente ocorre a elevadas temperaturas (100-140 °C).^[6] Estas aminas quando interagem com CO₂, formam inicialmente um *zwitteri*ão (reação 1) que em seguida transfere um próton formando-se um ião carbamato (reação 2). Quando se encontra a altas temperaturas, o carbamato, devido à sua forma instável^[18], consegue ser hidrolisado de modo a regenerar uma amina livre, formando bicarbonato. Desta forma a amina encontra-se novamente livre para reagir com CO₂ (reação 3).^[19] Este método apresenta a limitação destas alcanolaminas primárias/secundárias terem baixa capacidade de “loading” de reagir com o CO₂, sendo necessárias duas moléculas de amina para reagir com uma molécula de CO₂ (0.5 mol CO₂/1 mol de amina).^[19]



Nas aminas terciárias, como o MDEA, a via reacional depende da nucleofilicidade da água em vez da amina, formando-se ácido carbónico.^[18] Numa reação adicional, uma amina reage com uma molécula de CO₂ (1 mol CO₂/1 mol de amina) formando bicarbonato (reação 4), no entanto têm uma menor reatividade com o CO₂ relativamente às alcanolaminas primárias/secundárias.^[17]

Ainda que as alcanolaminas sejam bastante utilizadas no processo de absorção química de CO₂ devido às vantagens que apresentam, tais como, grande capacidade de absorção, reatividade e seletividade alta e baixo preço, existem desvantagens associadas ao uso destas soluções. As principais desvantagens que estas apresentam são o consumo de uma elevada quantidade de energia para a regeneração de absorventes^[20], provocam corrosão dos equipamentos e perda do solvente devido à sua volatilidade^[12], tornando o processo dispendioso e complexo.^[18]

De modo a superar estas as desvantagens, existe atualmente um enorme empenho na procura de alternativas às alcanolaminas, como por exemplo utilizar uma mistura de aminas, que maximiza as qualidades indesejadas das aminas individuais. Este

tipo de mistura inclui uma amina terciária e uma primária ou com uma amina secundária, deste modo há uma maior retenção de reatividade das aminas primárias e secundárias.^{[21],[6], [12]}

1.2.1.2 Adsorção de CO₂

A adsorção trata-se de um processo físico em que um gás ou líquido se liga a uma superfície sólida. O adsorvente que é utilizado durante o processo pode ser regenerado com a utilização de calor ou com redução de pressão.^[13] A adsorção de CO₂ pode ocorrer por adsorção física, havendo interação das moléculas de gás com a superfície do material com ligações de Van der Waals ou por adsorção química em que esta interação ocorre através de ligações covalentes.^[22]

Um bom adsorvente deve apresentar uma alta capacidade a baixa pressão e seletividade para o CO₂, cinética de adsorção/dessorção rápida, boas propriedades mecânicas, ótima estabilidade hidrotérmica e química e uma síntese de baixo custo.^[23]

Existe uma variedade de adsorventes que tem vindo a ser estudada nos últimos anos, dos quais se pode destacar materiais à base de carbono, zeólitos, carbonatos, sílica microporosa/mesoporosa, polímeros^[11] e adsorventes à base de aminas.^[23]

A utilização de um processo de adsorção capaz de capturar CO₂ apresenta potenciais vantagens em comparação com os solventes de aminas aquosas, tais como uma maior estabilidade térmica e mecânica, menos corrosão, menor consumo de energia na regeneração e uma menor necessidade de volume de absorvente.^[11]

1.2.1.3 Membranas para captura de CO₂

O processo de captura de CO₂ por membranas tem vindo a ser também estudado para a separação do CO₂ em fluxos de gás de combustão.^[24] As membranas funcionam como um filtro, permitindo que apenas (ou grande parte) do CO₂ passe pelo material. A força motriz deste processo é um diferencial de pressão ao longo da membrana.^[25]

Para que as membranas sejam viáveis para a separação de CO₂ é necessário possuírem especificações como, uma alta permeabilidade para o CO₂, alta seletividade CO₂/N₂ (o N₂ está presente nas emissões de gases de combustão), elevada resistência térmica e química, resistência ao envelhecimento e plastificação e baixo custo de

produção.^[26] Existem vários tipos de membranas que podem ser utilizadas: membranas poliméricas, membranas inorgânicas, membranas líquidas suportadas e membranas de matriz mista^[27] e e mais recentemente PILS (poli(líquidos iónicos)), isto é, polieletrólitos com líquidos iónicos como unidade monomérica, combinando as características dos ILs (estabilidade térmica e alta afinidade para com o CO₂) com a capacidade dos polímero de formarem filmes e materiais altamente porosos.^[11]

Este processo de captura de CO₂ com membranas apresenta vantagens em comparação com outros métodos de separação, nomeadamente no baixo consumo de energia, baixos custos de manutenção, podendo ser realizado a baixas e altas temperaturas e por ser um método simples e limpo.^[28]

1.2.1.4 Líquidos Iónicos (ILs)

Uma outra alternativa promissora para a captura de CO₂, passa pela utilização de outros solventes, tais como os líquidos iónicos.

Líquidos Iónicos (ILs) ou líquidos iónicos à temperatura ambiente (RTILs), são uma classe de solventes, formados por sais orgânicos ou iões carregados positivamente e negativamente (catiões e aniões), líquidos à temperatura ambiente ou abaixo dos 100 °C^{[29], [30]}. Isto ocorre, devido aos iões exibirem um elevado grau de assimetria, e o empacotamento das suas estruturas torna-se difícil, inibindo a cristalização.^[31]

Apresentam características únicas e atrativas, tais como baixa pressão de vapor, alta polaridade, poderem ser menos tóxicos (devido à baixa volatilidade), e uma boa estabilidade térmica^[32] e química^[30]. Os ILs podem então ser considerados excelentes alternativas aos solventes orgânicos convencionais,^[29] sendo capazes de dissolver tanto espécies inorgânicas como orgânicas.^[33] Pelo facto de existirem numerosas opções de combinação de pares de iões, é possível a formação de centenas de ILs, tendo cada um uma aplicação específica^[31], o que os torna em solventes *tailor-made*.

A Figura 1.2.3 apresenta alguns dos catiões mais utilizados na formação de líquidos iónicos.

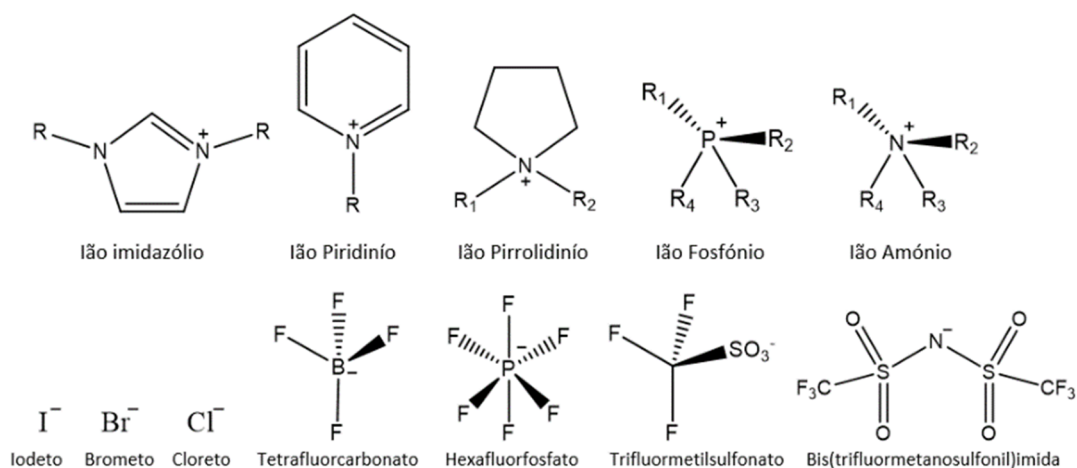


Figura 1.2.3 – Diferentes cátions e aniões que formam os líquidos iônicos. (adaptado M. Hasib-ur-Rahman et al., 2010)^[34]

Os líquidos iônicos têm diversas aplicações devido às suas características podendo ser aplicados em diversas áreas científicas e sectores industriais, sendo muito utilizados como substituintes de solventes em síntese orgânica e em catálise; em eletroquímica ao serem utilizados como eletrólitos e como combustível e células solares^[35]; em reações biológicas, sendo utilizados como suporte para imobilização de enzimas; em purificação de gases, podendo ser utilizados em captura de CO₂.^[29] Na Figura 1.2.4 encontram-se diversas aplicações que estes solventes podem ter em diversas áreas.



Figura 1.2.4 – Aplicações dos Líquidos Iônicos (Adaptado de Pham T. et al, 2010)^[36]

Como referido anteriormente, os ILs podem ser aplicados na captura/absorção de CO_2 , visto as suas propriedades únicas, p.e., baixo ponto de fusão, inexistência de pressão de vapor e características físico-químicas ajustáveis, tornando estes solventes excelentes substituintes das soluções de aminas.^[34]

O mecanismo de captura do CO_2 baseia-se tanto na absorção física, em que o CO_2 é dissolvido na fase líquida sem alteração da estrutura química, ou na absorção química havendo uma interação química entre as moléculas de IL e o CO_2 .^{[37], [38]} O tipo de absorção depende do líquido iónico utilizado, sendo que na maioria dos casos acontece absorção física.^[38]

A capacidade de absorção é menor que nas soluções de aminas comerciais, no entanto através da seleção dos grupos iónicos presentes na estrutura do líquido iónico^[11] ou combinando com outros solventes^[39] é possível aumentar a afinidade para com o CO_2 . Uma desvantagem da utilização de ILs é a sua elevada viscosidade, pois esta afeta o processo de absorção de CO_2 . A viscosidade pode ser ajustada com uma escolha apropriada da combinação catião e do anião. Quando são utilizadas altas temperaturas e pressões para a captura de CO_2 , a viscosidade não é tão preocupante, pois a elevadas temperaturas a viscosidade tende a diminuir.^[34]

Na Tabela 1.2.1.1 podemos verificar alguns valores existentes na literatura para a capacidade de absorção de CO_2 por parte de alguns líquidos iónicos já estudados.

Tabela 1.2.1.1 - Capacidade de CO₂ de líquidos iônicos com absorção física^[40]

| Líquido Iônico | Capacidade de absorção de CO ₂ | | Condições bar/K |
|--|---|-------------------------|--------------------|
| | Fração molar | g CO ₂ /g IL | |
| [bmim][PF ₆] | 0.36 | 0.087 | 29.5/313 |
| [C ₆ mim][PF ₆] | 0.299 | 0.06 | 25.7/313 |
| [C ₈ mim][PF ₆] | 0.353 | 0.07 | 29.5/313 |
| [C ₉ mim][PF ₆] | 0.357 | 0.069 | 19.2/298 |
| [emim][BF ₄] | 0.106 | 0.026 | 8.8/298 |
| [bmim][BF ₄] | 0.137 | 0.031 | 12.7/313 |
| [C ₆ mim][BF ₄] | 0.163 | 0.034 | 9.0/298 |
| [C ₈ mim][BF ₄] | 0.319 | 0.073 | 28.9/313 |
| [N-bupy][BF ₄] | 0.243 | 0.063 | 28.6/313 |
| [bmim][NO ₃] | 0.276 | 0.052 | 29.1/313 |
| [HOPmim][NO ₃] | 0.1004 | 0.024 | 21.4/315 |
| [emim][Tf ₂ N] | ~0.26 | 0.0395 | 12/298 |
| [bmim][Tf ₂ N] | ~0.4 | ~0.070 | 22.0/313 |
| [dmim][Tf ₂ N] | 0.562 | 0.112 | 28.3/298 |
| [hmim][Tf ₂ N] | 0.2535 | 0.033 | 13.7/313 |
| [P14,6,6,6][Tf ₂ N] | 0.6309 | 0.098 | 27.4/313 |
| [BMP][Tf ₂ N] | 0.35 | 0.056 | 19.3/313 |
| [bmim][DCA] | 0.1582 | 0.04 | 14.2/313 |
| [bmim][TfO] | 0.1088 | 0.019 | 10.4/313 |
| [emim][EtSO ₄] | 0.146 | 0.032 | 28.1/313 |
| [emim][C ₂ N ₃] | 0.9896 ^a | 0.044 | 28.1/313 |
| [emim][Ac] | 0.39 | 0.165 | 20/323 |
| [bmim][Ac] | 0.373 | 0.132 | 20/323 |
| [emim][TFA] | 0.2 | 0.049 | 20/323 |
| [bmim][SCN] | 0.126 | 0.032 | 16//313 |
| HEF | 0.110 | 0.051 | 22.2/313 |
| THEAA | 0.086 | 0.02 | 25.2/313 |
| HEAF | 0.068 | 0.021 | 22.2/313 |
| HEAA | 0.212 | 0.067 | 24.8/313 |
| [emim][MDEFSO ₄] | 1.1162 ^a | 0.049 | 28.9/313 |
| TEGO IL K5 | ~0.62 | ~0.079 | 30.0/300 |

^a mol kg⁻¹ IL.

Algumas desvantagens têm vindo a ser associadas a alguns IIs, especificamente a sua toxicidade, baixa biodegradabilidade e a presença de impurezas que alteram as propriedades dos ILs. Além destas, o elevado custo de produção fá-los restringir as suas aplicações industriais. Apesar dos líquidos iônicos continuarem a ser utilizados, emergiu nas últimas décadas uma nova classe de solventes, *Deep Eutectic Solvents* (DES), com algumas propriedades semelhantes aos ILs, contudo colmatam certas falhas que estes apresentam.^[41]

1.3 Deep Eutectic Solvents – DES

Nos últimos anos surgiram um novo tipo de solventes com algumas características semelhantes aos líquidos iónicos chamados de *Deep Eutectic Solvents* (DES). Um DES é composto por dois ou três componentes que são capazes de se ligar entre si através de ligações de hidrogénio, formando uma mistura eutética,^[42] i.e. com um ponto de fusão mais baixo do que cada componente individual^[43]. O DES é formado geralmente por um sal de haleto ou quaternário de amónio em combinação com um dador de ligações de hidrogénio (HBDs)^[44], que a uma determinada proporção e temperatura há um decaimento do ponto de fusão devido à deslocalização de carga que ocorre na ligação de hidrogénio, inibindo o processo de cristalização de cada componente, apresentando-se no estado líquido.^{[45], [46]} Na Figura 1.3.1 representa-se um exemplo de um diagrama de fases de dois componentes que formam uma mistura eutética.

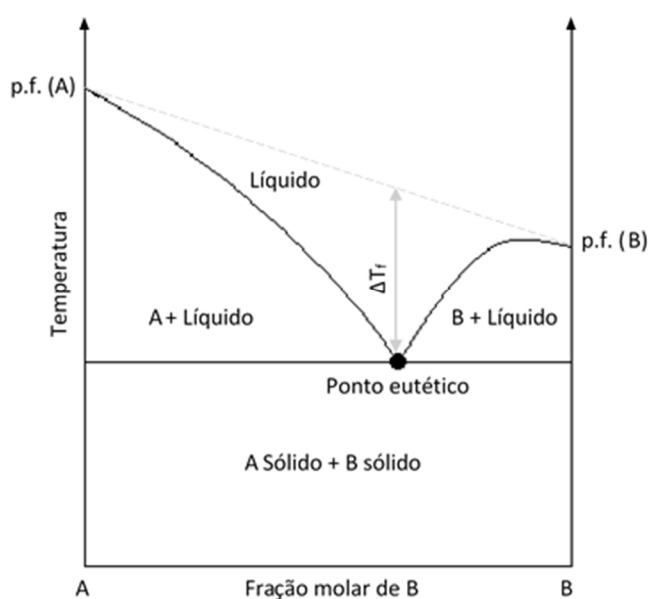


Figura 1.3.1 – Diagrama de fases de dois componentes com representação do ponto eutético.

O termo *Deep eutectic solvents* foi inicialmente introduzido por A.P. Abbott em 2003^[47] sendo um dos primeiros DES reportados a mistura de cloreto colina com ureia. O cloreto de colina é um dos sais quaternários de amónio mais utilizado na formação de DES pois é um aceitador de ligações de hidrogénio biodegradável, renovável, não-tóxico e barato pois existe em grandes quantidades.^[43] A ureia é um composto barato e seguro, um dador de ligações de hidrogénio assim como outros componentes tais como ácidos

carboxílicos renováveis (p.e. ácido oxálico, cítrico ou aminoácidos) ou polióis (p.e. glicerol ou carboidratos), que em combinação com o sal quaternário de amónio forma um DES.^[43] Diferentes estruturas de halogenetos e HBDs utilizados na síntese de DES estão representados na Figura 1.3.2.

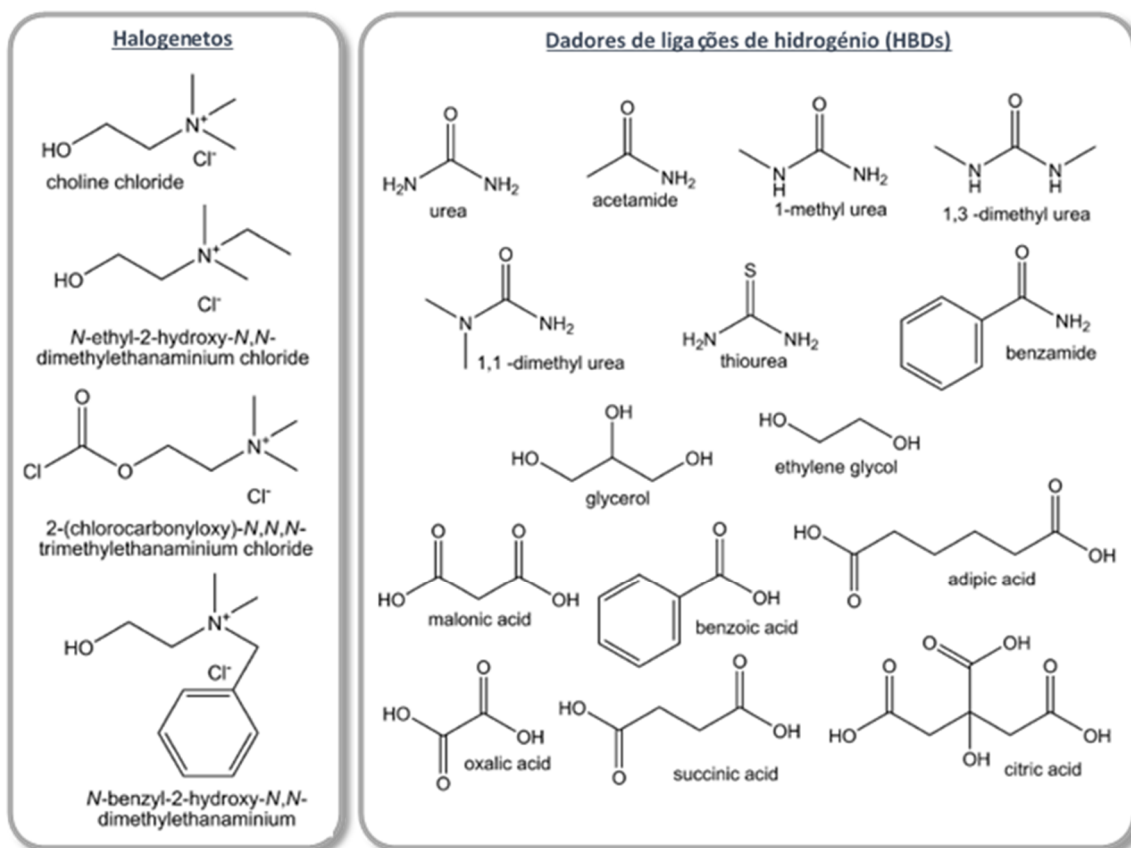


Figura 1.3.2 – Exemplos de possíveis halogenetos e HBDs utilizados para a síntese de DES.

Os DESs, por não serem constituídos interamente por espécies iónicas e também poderem ser obtidos a partir de espécies não iónicas, não podem ser classificados como líquidos iónicos,^[43] mas alguns DESs e os ILs convencionais apresentam propriedades físicas semelhantes como, baixa pressão de vapor, não inflamáveis,^[45] quimicamente inertes, viscosidade, densidade, tensão superficial, condutividade, entre outras.^[43] Apesar de partilharem características físicas, os DESs possuem vantagens em relação aos ILs: baixo preço de produção, preparação fácil sem necessidade de purificação dos constituintes a utilizar, fácil armazenamento e a maioria são biodegradáveis, biocompatíveis e não tóxicos.^[43] Estas vantagens tornam os DESs mais atrativos do que a maioria dos líquidos iónicos do ponto de vista da Química Verde.^[48]

Recentemente, devido às suas características e vantagens, várias aplicações dos DESs têm sido reportadas. Os DESs foram empregues em extração, permitindo uma maior solubilidade de certos compostos (sais inorgânicos, ácidos aromáticos e aminoácidos) ^[49], tendo também sido considerados como meios de extração eficientes para o biodiesel ^[48] e na obtenção do mesmo. ^[50] Para além destas aplicações, os DESs têm vindo a ser usados em aplicações industriais, assim como em solventes no processamento de metais, purificação de biodiesel, síntese de polímeros, solubilização de fármacos, transformações biológicas, separação de misturas azeotrópicas, biocatálise, electroquímica e na absorção de CO₂. ^{[49], [51]}

Em 2008, Li *et al.* ^[52] reportaram pela primeira vez dados para a solubilidade do CO₂ numa mistura eutética de cloreto colina e ureia com proporções molares de (1:1:5), (1:2) e (1:2:5), e variando a temperatura (313.15, 323.15 e 333.15 K), bem como a pressão até 13 MPa. ^[53] Este estudo permitiu concluir a solubilidade de CO₂ nos DESs dependia da sua razão molar, da pressão e da temperatura, verificando-se uma maior solubilidade quando aumenta a pressão e a temperatura mais baixas, e uma razão molar ChCl:ureia de 1:2. ^{[52], [53]}

A natureza dos doadores de ligações de hidrogénio dos DESs tem um papel fundamental na solubilidade de CO₂ nestes solventes. Por exemplo, numa mesma razão molar (1:2) se o HBD escolhido for o ácido láctico, a capacidade de absorção de CO₂ é mais baixa do que no ChCl:ureia, ao passo que quando usado glicerol ou etilenoglicol como HBDs a capacidade de absorção aumenta. ^[53]

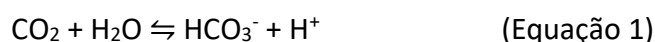
Em DESs baseados em cloreto colina, existem sempre pequenas quantidades de água, devido ao ChCl ser higroscópico. A água quando presente atua como um anti-solvente, afetando a solubilidade do CO₂. Su *et al.* estudaram a solubilidade de CO₂ em DES com presença de água, concluindo que a água absorvida pelos DESs compete com as moléculas de CO₂, diminuindo a capacidade de captura do CO₂ pelos DESs. ^[52]

1.4 Enzimas

Uma enzima é uma macromolécula de natureza regularmente proteica, que apresenta funções catalisadoras, catalisando reações químicas. A enzima acelera as reações através da diminuição da energia de ativação das mesmas, e deste modo permite o metabolismo dos seres vivos. A capacidade catalítica apresentada pelas enzimas torna-as interessante para diversas aplicações industriais, como por exemplo em têxteis, processamento de detergentes, alimentos, fármacos, entre outros.^[54]

1.4.1 Anidrase carbónica

A anidrase carbónica (CA) é uma metaloenzima com zinco presente na natureza,^[55] que regula processos biológicos importantes tanto nos humanos como em outros organismos vivos, nomeadamente no equilíbrio ácido-base no sangue, no mecanismo de fotossíntese das plantas e no mecanismo de concentração em microrganismos,^[56] ao catalisar a reação reversível de CO₂ a bicarbonato (Equação 1).^[57]



Esta enzima pode ser classificada em cinco categorias diferentes (α , β , γ , δ e ζ) conforme a sua estrutura e origem e a base da catálise desempenhada dependerá desse fator.^{[56], [58]} A forma α da anidrase carbónica é das mais estudadas, sendo maioritariamente encontrada em mamíferos. Nesta forma, a atividade enzimática deriva do centro ativo do ião Zn²⁺ coordenado com três resíduos de histidina.^[56] O centro ativo desempenha um papel importante na reação de hidratação do CO₂, onde o ião Zn²⁺ remove um protão de uma molécula de água envolvente, criando o ião hidróxido que pode atacar o átomo de carbono parcialmente positivo na molécula de CO₂ solubilizada para formar o ião HCO₃⁻.^[56]

A anidrase carbónica é uma das enzimas mais ativas que existem com uma taxa de *turnover*, isto é, o número de reações num único centro ativo, de 10⁶ s⁻¹.^[58] Devido à sua atividade elevada, a anidrase carbónica foi reconhecida como um potencial catalisador na captura de CO₂ de gases de combustão. Esta enzima torna-se também

atrativa devido a conseguir mostrar atividade dentro de uma gama de temperaturas entre os 20 e os 65 °C e entre um pH de 4 a 9.^[58]

A anidrase carbónica permite acelerar a reação e converter o CO₂ em bicarbonatos. Os bicarbonatos são compostos que podem ser úteis como matéria prima em outros meios, podendo ser reutilizados quando produzidos. Estes compostos são capazes de potenciar a produção de biomassa em sistemas com algas, sendo uma fonte direta ou indireta de carbono.^[59]

1.4.2 Imobilização de enzimas

A imobilização é um processo em que enzimas/células inteiras são aprisionadas a uma fase diferente daquela em que os substratos e os produtos estão presentes. O processo facilita a remoção de produto, reutilização de enzimas, maior eficácia devido à reutilização da enzima,^[60] podendo melhorar a termoestabilidade de vários tipos de enzimas.^[56]

Estão reportados alguns estudos de imobilização da anidrase carbónica em diversos tipos de materiais, como por exemplo, quitosano, partículas de carbono ativado, nanopartículas de ouro funcionalizadas com sílica^[56] e alginato de sódio.^[60] Para imobilizar a anidrase carbónica, foram utilizados diferentes métodos de imobilização, utilizando os materiais acima mencionados tais como, adsorção física, ligação covalente, hidrogéis, agregação *cross-linked* e adsorção eletrostática camada por camada (LbL).^[56]

1.5 *Electrospinning* (Eletrofiação)

A eletrofiação, do inglês *electrospinning*, é uma técnica que permite a produção de fibras de diâmetros à escala manométrica e sub-micrométrica, sendo possível um controlo das características das fibras produzidas tais como a sua composição, diâmetro e comprimento.^[61] É também um método utilizado para a imobilização de espécies, p.e. biomoléculas, facilitando processos de *drug delivery* ou de engenharia dos tecidos.^[62]

Apesar de se ter iniciado em 1897 por Rayleig, a descrição deste processo de eletrofiação surgiu pela primeira vez por Anton Formhals em 1934, patenteando uma montagem para a produção de filamentos poliméricos tirando partido das repulsões electroestáticas entre as cargas superficiais. Apesar disto, esta técnica só ganhou grande conhecimento anos mais tarde, sendo até então nomeada por “*electrostatic spinning*” ou fiação eletrostática ^{[61], [63]}, sendo reintroduzida como *electrospinning* em 1995 por Doshi e Renenker. ^[64]

Esta técnica por ser simples, económica e de grande versatilidade tem vindo a ser utilizada nos últimos anos em diversas áreas, como por exemplo em aplicações biomédicas e farmacêuticas, biotecnologia, na indústria têxtil, na engenharia alimentar, entre outras (Figura 1.5.1).^[65]

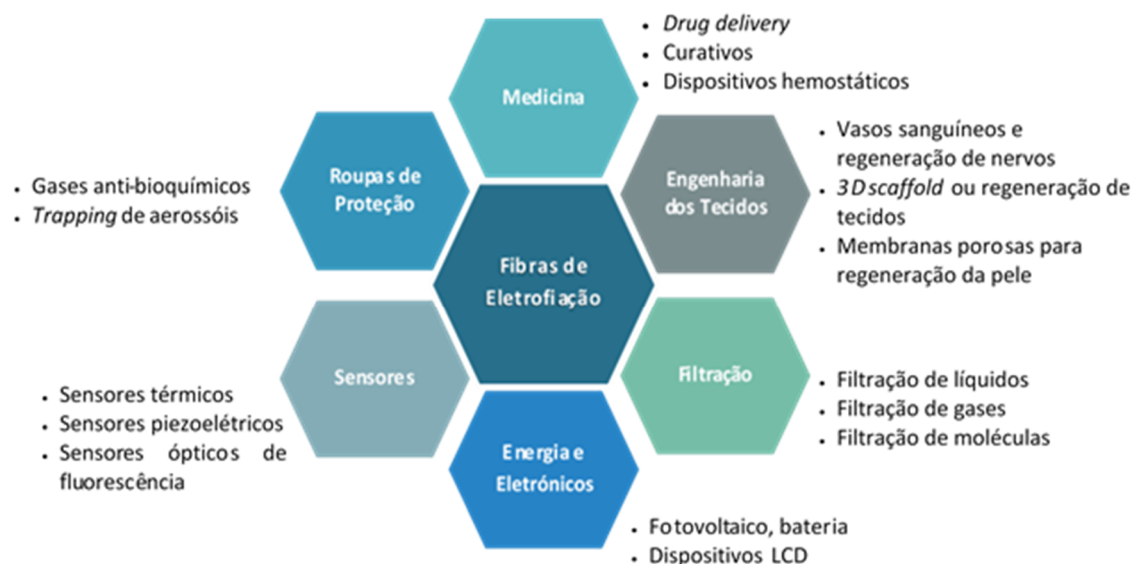


Figura 1.5.1 – Aplicações de fibras obtidas por eletrofiação.^[65]

O *electrospinning* é um processo de produção de fibras a partir de uma solução de polímero viscoso, através da aplicação de uma tensão (entre 1 e 30 kV) que carrega positivamente a solução. A repulsão entre estas cargas à superfície do fluido polimérico origina uma força repulsiva. A uma determinada tensão, a força repulsiva excede a tensão superficial da solução, criando um jato desde da ponta do capilar até a um coletor conectado à terra.^[65]

1.5.1 Processo de eletrofiação

A Figura 1.5.2 apresenta a constituição básica de uma montagem de *electrospinning*. Este consiste em três componentes principais: uma fonte de alta tensão, um coletor ligado à terra e uma agulha metálica ou capilar.^[61]

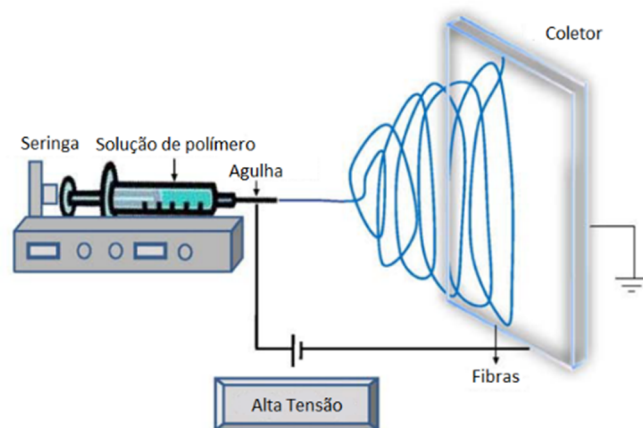


Figura 1.5.2 – Esquema de montagem laboratorial típica de *electrospinning*.

A agulha metálica ou capilar está ligada a uma seringa que no seu interior contém a solução de polímero que se pretende fiar. O conjunto seringa-agulha é colocado numa bomba que permite a produção de um fluxo contínuo e controlado de solução até à ponta do capilar, formando uma gota. Este capilar é ligado à fonte de alta tensão, de modo a elevar o potencial eletrostático do fluído. Como resultado, a gota formada experimenta forças eletrostáticas repulsivas, deformando a gota até atingir uma forma cônica conhecida como cone de Taylor. Um jato é então formado, a partir do cone de Taylor, quando as forças eletrostáticas vencem a tensão superficial da solução, ocorrendo a ejeção da solução até ao coletor ligado à terra. Durante esta fase, à medida que o jato percorre a distância entre a seringa e o coletor, o solvente utilizado na solução

evapora, formando um fio polimérico solidificado, sendo depositado aleatoriamente no coletor sob a forma de fibras ultrafinas.^[61]

1.5.2 Parâmetros do *Electrospinning*

No processo de eletrofiação é bastante importante controlar diversos parâmetros de modo a obter fibras com morfologias e diâmetros desejados. Estes parâmetros podem ser divididos em três categorias: parâmetros da solução, parâmetros do processo e parâmetros ambientais.^[66]

1.5.2.1 Parâmetros da Solução

Nos parâmetros da solução é necessário ter em conta diversas propriedades da solução, tais como viscosidade, condutividade, tensão superficial, momento dipolar e constante dielétrica, assim como peso molecular e concentração do polímero e solvente(s) utilizado(s)). Estas propriedades determinam a obtenção de fibras ultrafinas e de boa qualidade.^[61]

A baixas concentrações de polímero em solução dá-se *electrospray*, em que ocorre uma pulverização da gota, ou seja, libertação simultânea de pequenas gotas ao invés de uma eletrofiação.^{[66], [67]} Uma elevada concentração da solução polimérica pode, por outro lado, impossibilitar a formação de fibras. Relacionada com a concentração de polímero está a viscosidade da solução, sendo importante tanto na fase de iniciação do jato (visto que em soluções de elevada viscosidade é impossível a ejeção da solução através da agulha) como nas propriedades finais da nanofibra. Com uma baixa viscosidade não é possível a formação de fibras contínuas e lisas, formando-se *electrospray*, logo é necessário um bom ajuste da concentração para obter uma viscosidade que permita uma boa formação de fibras.^[66]

É igualmente importante ter em consideração o peso molecular do polímero. Este afeta a viscosidade da solução, pois o peso molecular reflete o entrelaçamento das cadeias poliméricas nas soluções. No entanto, o peso molecular não é sempre essencial para o *electrospinning* caso as interações intermoleculares possam ser fornecidas por oligômeros.^[66]

A tensão superficial é também um parâmetro importante a ser considerado no processo de *electropinning*. Segundo a literatura, este contribui para a existência ou não de contas no produto final, sendo possível converter uma fibra com contas para uma fibra lisa ao reduzir a tensão superficial. Esta redução pode ser atingida com a alteração da razão molar da mistura de solventes ou do solvente ou da sua concentração.^[66]

Quanto à condutividade da solução, sabe-se que o aumento da mesma e, portanto da densidade de cargas à superfície do fluido, pode ser utilizada para obter fibras com um menor número de contas.^[67]

1.5.2.2 Parâmetros do processo

Os parâmetros de processo incluem a tensão aplicada, o caudal, a distância ao coletor e o próprio coletor utilizado.

Como referido anteriormente, o processo de eletrofiação é iniciado quando aplicado uma tensão apropriada. A maioria dos autores refere que existe uma redução do diâmetro da fibra e evaporação rápida do solvente como resultado de uma maior tensão aplicada provocando um maior alongamento da solução devido às forças de Coulomb no jato, bem como de um campo elétrico mais forte. Numa tensão muito elevada, existe uma enorme probabilidade de haver formação de contas e gotas (*spray*) na deposição.^[68] Outro parâmetro que influencia o diâmetro da fibra é o caudal empregado. O caudal está relacionado com a quantidade de solução à saída da agulha e, conseqüentemente, com o tempo necessário para a sua polarização e o campo elétrico necessário para promover o estiramento do jato. Ao aumentar o caudal e mantendo o potencial, poderá haver o aparecimento de contas nas fibras, bem como um aumento do seu diâmetro. Deste modo, graças ao aumento do volume de solução na ponta da agulha, o jato leva mais tempo a secar, isto é, o solvente poderá não ter tempo suficiente para evaporar antes de atingir o coletor.^[69]

A distância entre a ponta da agulha e o coletor também afeta a morfologia e o diâmetro da fibra. A distância, tal como o caudal influencia o tempo de evaporação do solvente, bem como no campo elétrico. Ao ser reduzida a distância entre a agulha e o coletor, o jato percorrerá uma menor distância, que conseqüentemente aumenta o campo elétrico, e deste modo a aceleração do jato até ao coletor é superior, resultando

num curto tempo de secagem. Isto poderá originar aparecimento de contas ou mesmo a fusão das fibras.^[69]

1.5.2.3 Parâmetros ambientais

Os parâmetros ambientais incluem a temperatura e a humidade do ambiente em que está a ser feito o processo de eletrofiação. O aumento da temperatura resulta numa evaporação mais rápida do solvente, ajudando, quando o caso, solventes com uma baixa taxa de evaporação. Quando utilizados solventes muito voláteis na mistura polimérica, o cone de Taylor tende a secar de forma mais rápida e uma humidade baixa pode aumentar a taxa de evaporação do solvente, deste modo a combinação solvente/humidade deve ser ajustada para ser possível a produção de fibras de qualidade. Os níveis de humidade utilizados influenciam o diâmetro da fibra bem como a morfologia da superfície das fibras, no entanto um aumento controlado da humidade pode facilitar a formação da fibra.^[66]

1.5.3 Eletrofiação do PVA (álcool polivinílico)

As soluções utilizadas em *electrospinning* são principalmente constituídas por polímeros dissolvidos em solventes apropriados, tendo em conta as suas características e a relação com o próprio polímero. No processo de eletrofiação são utilizados inúmeros polímeros.

Um exemplo de polímero é o álcool polivinílico (PVA). O PVA (Figura 1.5.3) é um polímero semicristalino e hidrofílico que apresenta boas propriedades físicas^[70], boa estabilidade térmica, resistência química, biocompatível, baixo preço^[71], não tóxico e é facilmente processado^[72], recebendo deste modo bastante atenção. Este polímero é solúvel em água, mas tem capacidade de formar géis físicos com diversos tipos de solventes. Todas estas propriedades levam o PVA a ser usado numa vasta gama de aplicações em aplicações médicas, na cosmética, indústria alimentar, farmacêutica, entre outras.^[72]

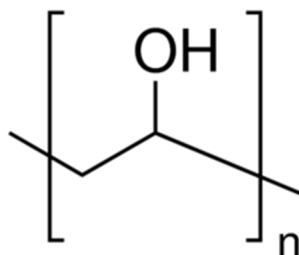


Figura 1.5.3 – Estrutura do PVA. (n=nº de repetições do monómero).

Diversas técnicas têm vindo a ser aplicadas para o processamento de soluções contendo PVA, incluindo sol-gel. Recentemente, devido às vantagens do *electrospinning*, esta técnica começou a ser utilizada na produção de fibras de PVA.^[71] Este tipo de fibras formadas com PVA podem ter diversas utilidades, por exemplo, membranas de imobilização e libertação de enzimas e membranas antimicrobianas com nanopartículas.^[71]

Devido ao elevado interesse da formação de fibras de PVA têm sido reportados vários estudos de como diversas propriedades do polímero, como peso molecular, tensão superficial, viscosidade, entre outros, influenciam a origem e a estrutura de fibras por *electrospinning*, assim como as condições deste.^[72] Na Figura 1.5.4 pode-se observar imagens obtidas por SEM de fibras de PVA com diferentes condições de um estudo realizado por Supaphol *et. al* em 2008.^[71]

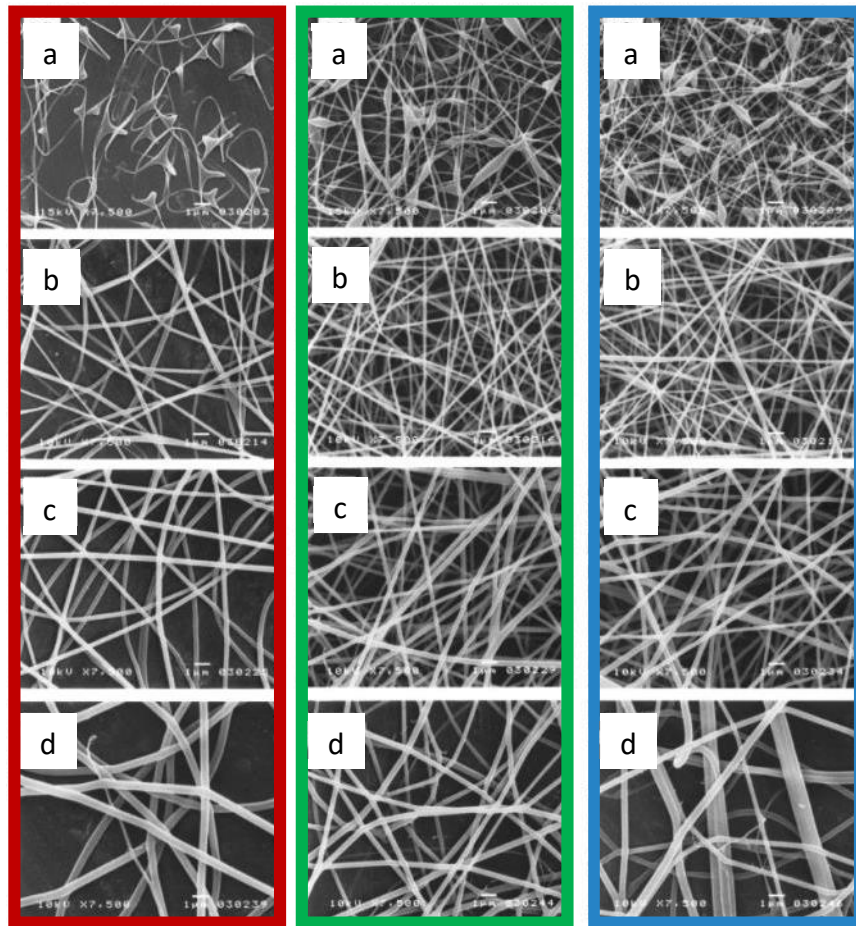


Figura 1.5.4 – Imagens de SEM de fibras de soluções de PVA a) 6%, b) 8%, c) 10%, d) 12%. As imagens contornadas a vermelho foram obtidas com um potencial elétrico de 12.5 kV, a verde com 17.5 kV e a azul com 22.5 kV. Todas elas com uma distancia de 15 cm e uma taxa de deposição de 1 mL/h.^[71]

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 DES (*Deep eutectic solvents*)

Diferentes tipos de produtos foram utilizados na preparação de DES como ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos e aminas. Os componentes utilizados foram cloreto de colina (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$, MW=139.62 g/mol), ureia (Merck, $\geq 99.5\%$, MW=60.06 g/mol), glicerol (Sigma-Aldrich, 99.5%, MW=92.09 g/mol), diethanolamina (DEA) (Sigma-Aldrich, 98%), DL-ácido láctico (TCI, $>85\%$), betaína (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$, MW=117.15 g/mol), DL-prolina (Aladrich, 99%), ácido oxálico (Alfa Aesar, 98%, MW=90.04 g/mol), L-mentol (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$, MW=156.27 g/mol) e ácido laurico (Sigma-Aldrich, $>98\%$)

2.1.2 Polímeros e solventes

Os componentes utilizados para formação de soluções poliméricas para obtenção de fibras por eletrofiação foram PVA (polivinilalcool) (Sigma Aldrich, 95% hidrolisado, MW 95 000 e Acros, 96% hidrolisado, MW 95 000), acetato celulose (Sigma-Aldrich, MW 200 000), água desionizada, DMAc (dimetilacetamida) (Fluka, $\geq 99.5\%$, MW=87.12 g/mol), ácido acético (Merck, 100%, MW=60.05 g/mol) e acetona (Panreac, 99.5%).

2.1.3 Enzima e solventes

Neste estudo, foi utilizada como enzima a anidrase carbônica de eritrócitos de bovino da Sigma Aldrich (pó liofilizado, $\geq 2,000$ unidades W-A/mg de proteína).

Para os ensaios enzimáticos foram utilizados os seguintes reagentes: HCl (Basic Scharlau, 37%, MW=36.46 g/mol); Trizma[®] base (Riedel-de Haën, $\geq 99.5\%$, MW=121.14 g/mol); água desionizada; acetato 4-nitrofenil (p-NPA) (Sigma Aldrich, substrato de esterase, MW=181.15 g/mol) e acetonitrilo (Sigma Aldrich, $\geq 99.9\%$, MW=41.05 g/mol).

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação dos DES

A preparação deste tipo de solventes eutéticos foi realizada de forma simples, envolvendo apenas agitação e aquecimento até 100 °C até obter uma solução líquida, incolor e homogênea.

Os compostos foram pesados e medidos os volumes para obter a razão molar desejada. Após obtenção de soluções líquidas, viscosas e incolores, os DES preparados não sofreram qualquer processo de purificação ou evaporação sobre vácuo.

Tabela 2.2.1.1 - Lista de Deep Eutectic Solvents usados no presente estudo, com respectivas razões molares e temperatura de preparação.

| Composição | Razão Molar | Temperatura (°C) |
|--|-------------|-------------------|
| Cloreto de colina: Ureia (ChCl:U) | 1:2 | 60 |
| Cloreto de colina: Glicerol (ChCl:G) | 1:2 | 60 |
| Cloreto de colina: Ácido láctico (ChCl:LA) | 1:2 | 60 |
| Cloreto de colina: DEA (ChCl:DEA) | 1:6 | 60 |
| Ácido láctico: Prolina (LA:Pro) | 1:1 | 60 |
| Betaina:Ureia: Água (Bet:U:W) | 1:2:1 | 100 |
| Mentol: Ácido Laurico (Men:LA) | 2:1 | t.a. ⁱ |
| Cloreto de colina: Ácido Oxálico (ChCl:OA) | 2:1 | 60 |

ⁱ t.a. – temperatura ambiente

2.2.2 Preparação das soluções de polímero

Para este trabalho foram utilizadas diferentes soluções poliméricas para obtenção de fibras por *electrospinning*. Na Tabela 2.2.2.1 estão descritos os polímeros e respectivos solventes usados na preparação das soluções, assim como as respectivas concentrações (w/v) e temperaturas a que se procedeu a dissolução.

As misturas de solventes utilizadas foram efetuadas numa razão volume/volume e agitadas à temperatura ambiente durante uns minutos com o auxílio de um agitador magnético. A dissolução destas com o respetivo polímero deu-se a uma temperatura

constante com ajuda de um banho de água e de agitação contínua até à formação de uma solução homogénea, translúcida e viscosa. Existiu um especial cuidado em preparar a solução de acetato de celulose em ácido acético:água no máximo 24 horas antes da realização da técnica de *electrospinning*, visto que o acetato de celulose é pouco estável no solvente utilizado e tende a degradar-se com o tempo.

Tabela 2.2.2.1 - Polímeros e respetivos solventes utilizados na preparação das soluções poliméricas, assim como a percentagem em peso/volume, a temperatura de dissolução e o nome atribuído.

| Polímero | Solvente(s) | % (w/v) | Temperatura (°C) | Nome |
|-----------------------|----------------------------|---------|------------------|-----------|
| Acetato celulose | DMAc:Acetona (70:30) | 12 | 40 | 12CA_DMAc |
| | Ácido Acético:Água (75:25) | 15 | 50 | 15CA_AA |
| | | 13 | 50 | 13CA_AA |
| Polivinilalcool (PVA) | Água | 9 | 80 | 9PVA_W |

2.2.3 Solubilidade e preparação dos DES em soluções poliméricas

Antes da preparação das soluções de polímero com DES, foi testada a solubilidade dos DES sintetizados em 2.2.1 com as soluções de polímero apresentadas na Tabela 2.2.2.1.

Para uma solução de 12% acetato de celulose em DMAc:Acetona foram testadas diferentes percentagens de DES na mesma solução, 1%, 2%, 5%, 10% e 15% (v/v), à temperatura ambiente e variando a temperatura entre os 30-80 °C. Os DES foram também dissolvidos nas percentagens 1% e 2% (v/v) numa solução de 15% acetato de celulose em ácido acético:água, à temperatura ambiente e num banho de água variando a temperatura entre os 30-80 °C. Todos estes testes foram realizados num volume máximo de 1 ml.

Numa solução de 9% PVA em água testou-se a dissolução de 0,5%, 1% e 2% (v/v) de DES à temperatura ambiente.

As melhores condições para a preparação final das soluções de polímero e DES encontra-se na Tabela 2.2.3.1.

Tabela 2.2.3.1 - Condições de preparação das soluções de polímero e DES.

| Solução de polímero | DES | Fração volumétrica de DES (v/v) | Temperatura (°C) |
|---|---------------------|---------------------------------|-------------------|
| 15% (w/v) Acetato de celulose em ácido acético:água | ChCl:Ureia (1:2) | 2% | 80 |
| 13% (w/v) Acetato de celulose em ácido acético:água | ChCl:Ureia (1:2) | 2% | 80 |
| 9% (w/v) PVA em água | ChCl:Ureia (1:2) | 0.5% | t.a. ⁱ |
| | | 2% | t.a. |
| | ChCl:Glicerol (1:2) | 2% | t.a. |

ⁱ t.a. – temperatura ambiente

2.2.4 Preparação da solução de PVA com DES e enzima

Além da adição do DES à solução polimérica, fez parte deste estudo a adição de uma enzima no sistema polímero+DES.

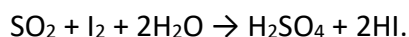
O procedimento utilizado para a preparação desta solução foi simples, tendo sido utilizada uma solução de 9% (w/v) PVA em água com 0,5% (v/v) ChCl:Ureia. A esta solução foi adicionada o pó liofilizado da enzima anidrase carbónica numa concentração 0.5 mg/ml e dissolvida à temperatura ambiente.

2.2.5 Caracterização Química

2.2.5.1 Determinação do conteúdo de Água

De modo a quantificar a percentagem de água presente nos DES descritos anteriormente, foi empregue o método de titulação de Karl-Fischer usando um Coulómetro 831 KF (Metrohm) (Figura 2.1.1).

O método de Karl-Fischer (KF) é um método analítico, baseado na reação de Bunsen, usada na determinação de dióxido de enxofre em soluções aquosas, segundo a seguinte reação



Para além disto, esta reação também pode ser utilizada na determinação de água, caso exista dióxido de enxofre em excesso e os ácidos que são produzidos serem neutralizados por uma base.^[73]

A quantidade de água na solução testada é medida com base na reação entre água e iodo, presente no reagente de KF, numa proporção molar de 1:1. A quantidade de água presente vai ser diretamente proporcional ao produto gerado nesta reação e detetado pelo aparelho de Karl-Fisher. O reagente de KF é composto por um álcool, uma base, SO_2 e I_2 , sendo o usado neste estudo o Hydranal Coulomat AG (Sigma-Aldrich). Este processo de quantificação é realizado à temperatura ambiente e foram feitas, pelo menos, três medições por amostra.



Figura 2.2.1 – Coulómetro de Karl-Fischer

2.2.5.2 Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica analítica que permite a caracterização e identificação de materiais e compostos químicos. Baseia-se na absorção da radiação de infravermelho pelo material de uma amostra; esta radiação quando absorvida a comprimentos de onda específicos causa uma mudança do momento dipolar das moléculas da amostra. O espectro obtido resulta dos diferentes modos de vibrações das ligações químicas do composto analisado.^[74]

No presente trabalho, foi utilizada a técnica de reflectância total atenuada (ATR – *attenuated total reflectance*), permitindo a análise direta de amostras líquidas ou sólidas, sem a necessidade de utilizar células de transmissão ou pastilha de KBr.^[75]

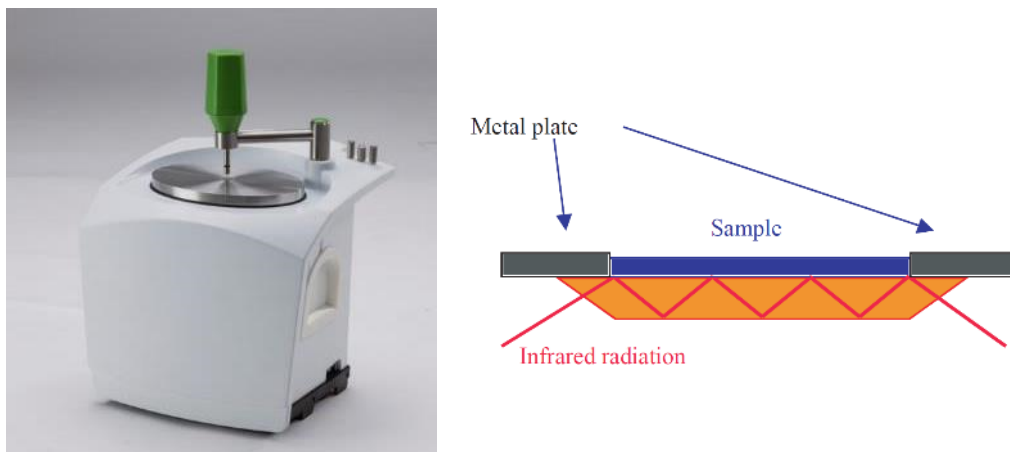


Figura 2.2.2 – a) Acessório de ATR utilizado no espectrofotômetro; b) Uma célula de ATR.

Na técnica de ATR a amostra é colocada em contacto com um cristal de ATR, (absorvente de radiação infravermelha e com alto índice de refração) em que o feixe de radiação infravermelha emitido, a um determinado ângulo, entre em contacto com a amostra e é totalmente refletido na superfície interna do cristal, medido as alterações/atenuações que ocorrem.^[76]

A utilização no modo ATR pode ser vantajosa, dispensando a preparação de amostra, evitando o uso de pastilhas de KBr e possíveis interações desta com a amostra, e possibilita a obtenção de espectros de soluções viscosas (polímeros e DES) e com sólidos (fibras).

A análise por FTIR permitiu também estudar a presença de grupos funcionais nas amostras utilizadas e as possíveis interações dos DES com os polímeros.

Para este trabalho, a obtenção de espectros de IV foi realizada em modo de transmitância, utilizado um espectrómetro FTIR Spectrum Two™ da Perkin Elmer equipado com um sistema ATR, numa gama espectral entre os 4000-400 cm^{-1} .

2.2.6 Caracterização Morfológica

2.2.6.1 Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A SEM é uma técnica de microscopia que permite obter uma imagem que providencia informações como, topografia, morfologia e composição da amostra fornecida.

Esta técnica baseia-se no uso de um feixe de eletrões de alta energia, que ao incidir num ponto da amostra-alvo gera uma variedade de sinais derivados das interações entre o eletrão e a amostra.^[77] O feixe com eletrões acelerados carrega quantidades significantes de energia cinética, que é dissipada quando entra em contacto com a amostra (os eletrões incidentes são desacelerados), dando origem aos vários sinais produzidos pelas interações eletrão-amostra. Os sinais formados podem envolver diversos tipos de radiação e eletrões, entre os quais os eletrões secundários responsáveis por mostrar a morfologia e topografia.^[77]

Nesta tese, a técnica de SEM foi usada para avaliar a morfologia externa das fibras de *eletrospinning*, antes e depois de ser adicionado solvente eutético (DES) à mistura polimérica.

Os resultados de SEM foram obtidos com um SEM modelo DSM962 da Zeiss localizado no CENIMAT|i3N – FCT/NOVA. As amostras foram fixadas com fita dupla condutora de carbono num suporte de metal e revestidas em ouro antes da sua observação.

2.2.7 Caracterização Mecânica

2.2.7.1 Testes de tração

O teste de tração é uma forma de determinar como um material reage quando se encontra sob carga de tração axial.^[78] Os dados obtidos no teste são usados na determinação da resistência à tração, tensão de rutura, extensão à rutura (ductilidade) e módulo de elasticidade (módulo de Young), através da construção de um gráfico com uma curva de tração (tensão vs. extensão).^[78]

O módulo de Young é a medida da rigidez elástica de um material, podendo ser calculado através do gráfico tensão vs. extensão, na região elástica, em que o material obedece à Lei de Hooke, onde a razão tensão/extensão é uma constante. Esta razão é dada pela equação $E = \sigma / \varepsilon$, onde E é o módulo de Young, σ é a tensão e ε a extensão. Quanto maior o módulo de Young mais rígido é o material.^[79]

Os ensaios foram realizados numa máquina de tração Rheometric Scientific (Minimat Firmware 3.1). Neste ensaio as fibras obtidas anteriormente por

eletrospinning foram cortadas com uma largura entre 66 e 106 mm. A espessura de cada amostra foi medida em cinco pontos diferente da fibra e calculado o valor médio para utilização no ajuste do sistema computacional. O espaçamento entre garras usado foi entre os 22 mm e os 32 mm, com uma velocidade de 1.5 mm/min. Os testes de tração foram realizados até à rutura da amostra. Os resultados apresentados são a média de pelo 4 medidas para cada amostra e o respetivo desvio padrão.



Figura 2.2.3 – Máquina de tração utilizada nos testes de tração, Rheometric Scientific (Minimat Firmware 3.1).

2.2.8 Reologia

A viscosidade é a medida da resistência de um fluído à deformação (escoamento). Quando a relação entre a tensão de corte e o gradiente local de velocidade (taxa de corte) de um fluído é linear, sendo a viscosidade uma contante, o fluído é denominado de newtoniano (segue a Lei de Newton). Os fluídos são designados não newtonianos quando essa relação não é constante, podendo ser divididos em reofluidificantes se a sua viscosidade diminuir ou reoespessantes se a sua viscosidade aumentar. ^[80]

$$\tau = \mu \frac{dv}{dy} \text{ (Lei de Newton)}$$

τ – tensão de corte, g/cm.s²

$\frac{dv}{dy}$ – taxa de corte, s⁻¹

μ – viscosidade, cP = 10⁻² g/cm.s = 0.001

kg/m.s = 10⁻³ N.s

A medição de viscosidade é essencial na caracterização dos DES, pois esta característica influencia algumas das suas propriedades. É também importante estudar a viscosidade das soluções de polímero, visto que esta característica da solução está relacionada com a obtenção de fibras pela técnica de eletrofiação. Neste estudo a viscosidade das amostras preparadas foi medida com um reómetro Bohlin Gemini HR^{nano} da Malvern (CENIMAT – FCT/UNL), com oscilador de stress controlado. Para os ensaios realizados foi usada a técnica de pratos paralelos e a uma temperatura de 25 °C, em estado estacionário. Para garantir o estado estacionário foi realizado um pré-*shear* às amostras a analisar

2.2.9 *Electrospinning*

2.2.9.1 Soluções de polímero e polímero/DES para *electrospinning*

Para a produção de fibras pela técnica de eletrofiação foram selecionadas algumas das soluções testadas e preparadas nos tópicos prévios 2.2.2 e 2.2.3, sendo estas a que poderão demonstrar mais interesse para o presente estudo. Na Tabela 2.2.9.1 e Tabela 2.2.9.2, estão descritas as diferentes soluções utilizadas em *electrospinning*.

Tabela 2.2.9.1 – Soluções utilizadas na técnica de *electrospinning*.

| Solução de polímero | DES | Fração volumétrica (v/v) | Nome |
|---|---------------------|--------------------------|------------|
| 12% (w/v) Acetato de celulose em DMAc:acetona | n.a. ⁱⁱ | n.a. ⁱⁱ | 17CA_DMAc |
| 15% (w/v) Acetato de celulose em ácido acético:água | n.a. ⁱⁱ | n.a. ⁱⁱ | 15CA_AA |
| | ChCl:Ureia (1:2) | 2% | 15CA_2CU |
| 13% (w/v) Acetato de celulose em ácido acético:água | ChCl:Ureia (1:2) | 2% | 13CA_2CU |
| 9% (w/v) PVA em água | n.a. ⁱⁱ | n.a. ⁱⁱ | 9PVA_W |
| | ChCl:Ureia (1:2) | 0.5% | 9PVA_0.5CU |
| | | 2% | 9PVA_2CU |
| | ChCl:Glicerol (1:2) | 2% | 9PVA_2CG |

ii – não aplicável

Para além destas soluções, foi também tentado a obtenção de membranas de fibras com uma solução com a adição do DES. A respetiva solução está descrita na Tabela 2.2.9.2.

Tabela 2.2.9.2 - Solução utilizada na técnica de *electrospinning* com enzima

| Solução de polímero com enzima e DES | Nome |
|--|-------------|
| 9% (w/v) PVA em água + 0.5% (v/v) ChCl:U + 0.5 mg/mL de CA | 9PVA_0.5CUE |

2.2.9.2 Montagem de *Electrospinning*

A montagem de *elctrospinning* utilizada neste trabalho, consiste numa bomba de infusão NE-300, que garante um fluxo constante de saída da solução de polímero pelo sistema agulha-seringa, ligada a uma fonte de alta tensão Glassman High Voltage. De forma a uniformizar o campo elétrico utilizou-se um aro de metal, também ligado à fonte de tensão. Para coletar as fibras usou-se um coletor fixo coberto com folha de alumínio. As agulhas de metal usadas tinham diferentes diâmetros 20G (0.84 mm) e 27G (0.25 mm) da ITEC.

Todos os equipamentos da montagem de *eletrospinning*, à exceção da fonte de alta tensão, encontram-se numa caixa de acrílico, de forma a controlar as condições ambientais. Para ajustar a temperatura ambiente para valores mais altos foi utilizado um secador elétrico ou o ar condicionado da sala. Um desumidificador, assim como o ar condicionado, foi necessário para o ajuste da humidade.

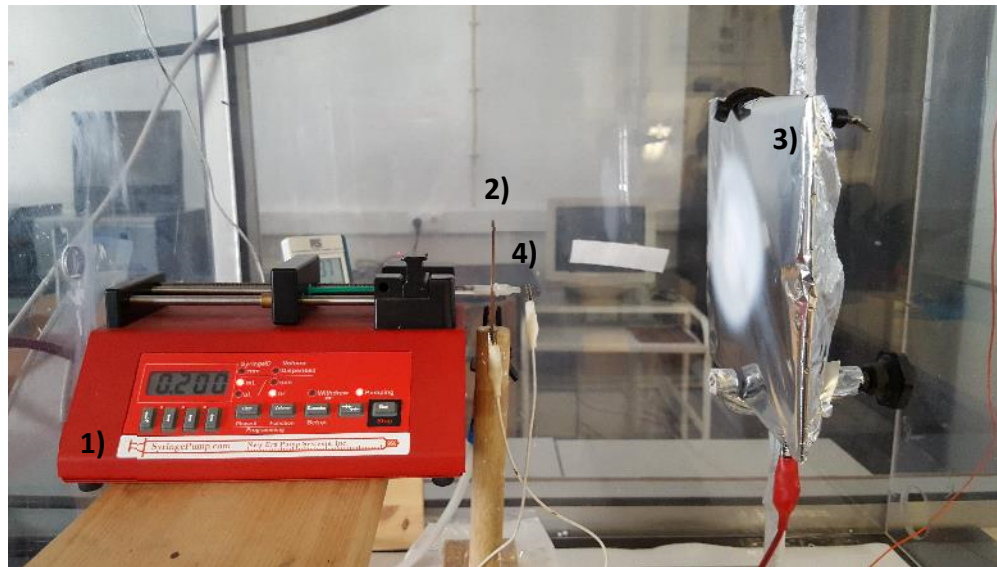


Figura 2.2.4 – Montagem de *eletrospinning* utilizada sem a fonte de tensão. 1) bomba de infusão; 2) anel condutor; 3) coletor com folha de alumínio; 4) sistema agulha-seringa.

2.2.9.3 Condições de *electrospinning*

De forma a obter fibras pela técnica de *electrospinning* é necessário ter em consideração vários parâmetros como, temperatura, humidade, caudal, distância agulha coletor, tensão aplicada e a agulha utilizada. Para as amostras 12CA_DMAC, 15CA_AA, 15CA_2CU e 13CA_2CU foi utilizada uma agulha de calibre 20G (diâmetro = 0.84 mm) e para as restantes amostras foi usada uma agulha de calibre 27G (diâmetro = 0.25 mm).

Na Tabela 2.2.9.3 estão representadas as condições utilizadas para eletrofiar as soluções preparadas anteriormente, após otimização dos parâmetros do *electrospinning*.

Tabela 2.2.9.3 – Condições de *electrospinning* utilizadas para diferentes soluções.

| Amostra | Temperatura (°C) | Humidade % | Caudal (mL/h) | Tensão (kV) | Distância (cm) |
|-------------|------------------|------------|---------------|-------------|----------------|
| 12CA_DMAc | 20.3 | 49 | 0.2 | 20 | 15 |
| 15CA_AA | 25.5 | 43 | 1 | 20 | 10 |
| 15CA_2CU | 24 | 49 | 1 | 20 | 10 |
| 13CA_2CU | 24-25 | 44 | 0.2 | 20 | 10 |
| 9PVA_W | 24 | 41-43 | 0.2 | 17.5 | 12 |
| 9PVA_0.5CU | 24 | 41-43 | 0.2 | 17.5 | 12 |
| 9PVA_2CU | 28 | 35-41 | 0.2 | 20 | 12 |
| 9PVA_2CG | 28 | 35-41 | 0.2 | 20 | 12.5 |
| 9PVA_0.5CUE | 24-21 | 40-38 | 0.2 | 17.5 | 12 |

2.2.10 Determinação da atividade enzimática da anidrase carbónica

De modo a determinar a atividade enzimática da enzima usada na presente tese, a anidrase carbónica, foram testados dois métodos diferentes, de Wilbur-Anderson e de um método colorimétrico que mede a atividade da esterase.

2.2.10.1 Método de Wilbur-Anderson

O método eletrométrico de Wilbur-Anderson baseia-se na determinação do tempo necessário para uma solução saturada de CO₂ baixe o pH do tampão Tris-HCl (0.02 M) de 8.3 para 6.3 a uma temperatura de 0 °C.^[81]

A atividade da anidrase carbónica foi medida a partir da hidratação do dióxido de carbono, com um protocolo adaptado do Worthington Enzyme Manual^[81] descrito no Anexo I. As medições de pH foram realizadas com um elétrico de pH Basic 20 da Crison.

A medição da atividade enzimática nas amostras de fibra com a enzima, foi feita da mesma forma que na enzima livre com alteração na forma como adicionada a fonte enzimática. Enquanto que para enzima livre é utilizada uma solução de anidrase carbónica em água desionizada, aqui uma pequena amostra com cerca de 10 mg de fibra é adicionada.

2.2.10.2 Método colorimétrico

A atividade da anidrase carbónica pode ser determinada através do seguimento de uma reação de hidrólise, catalisada pela esterase. O centro ativo da enzima é responsável pela aceleração da hidratação do CO_2 assim como para a hidrólise ésteres. Esta determinação da atividade de CA (anidrase carbónica) baseia-se no uso do acetato para-nitrofenil (pNPA) como substrato que forma um produto amarelo (para-nitrofenol) a que absorve radiação a 405 nm.^[82]

A atividade da esterase foi medida tendo como base o método descrito por Kaar J. *et. al* ^[83] com algumas alterações. Para a enzima livre, o tampão Tris-HCl (650 μl , 50 mM, pH=7.5) foi adicionado a uma cuvette de quartzo e de seguida foram adicionados 100 μl de solução de enzima CA livre dissolvida em tampão Tris-HCl (0.5 mg/ml). Por último, foi adicionado o substrato pNPA dissolvido em acetonitrilo (10 μl , 40 mM), seguindo-se da medição da atividade enzimática espectrofotometricamente usando um UV Heλios γ da Thermo Electron Corporation, monitorizando a hidrólise de p-NPA a p-nitrofenol a 405 nm. As absorvâncias foram registadas a cada 30 segundos durante 3 minutos. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima requerida para gerar 1 μmol de p-nitrofenol por minuto. O coeficiente de extinção molar do p-NP utilizado foi $11.60 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A atividade da enzima quando encapsulada na fibra é medida pelo mesmo procedimento com algumas modificações. Ao invés de uma solução de enzima CA livre em tampão, é utilizada uma fibra obtida por eletrofiação com uma recolha de cerca de 0.7 ml, sendo lavada/dissolvida com 1 ml de tampão. A partir desta solução foram então retirados os 100 μl e procedeu-se como descrito anteriormente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Propriedades dos DES

3.1.1 Conteúdo de água presente em DESs

Os DESs baseados em cloreto de colina apresentam normalmente pequenas quantidades de água na sua composição, devido ao cloreto de colina ser muito higroscópico. A presença de água pode modificar as interações entre os componentes constituintes do DES e por sua vez causar impacto para futuras aplicações. A solubilidade de CO₂ é influenciada pela presença de água, uma vez que esta age como um anti-solvente e a solubilidade de CO₂ diminui quando presente.^[39] Assim, para este trabalho, DESs com elevadas quantidades de água não são convenientes, dado que a finalidade é a captura de CO₂. Para tal conteúdo de água presente em cada DES foi determinado pelo método de Karl-Fischer e os resultados podem ser observados na Tabela 3.1.1.1. Os DESs ChCl:U (1:2), ChCl:G (1:2), ChCl:DEA (1:6) e Men:LA (2:1) apresentam uma percentagem de água inferior a 1%, ao passo que os restantes superior a 5%.

Tabela 3.1.1.1 - Percentagem de água presente em cada DES, obtidos pelo método de Karl-Fischer.

| Composição | Água (%) |
|-----------------|----------|
| ChCl:U (1:2) | 0.46 |
| ChCl:G (1:2) | 0.71 |
| ChCl:LA (1:2) | 7.12 |
| ChCl:DEA (1:6) | 0.39 |
| LA:Pro (1:1) | 9.18 |
| Bet:U:W (1:2:1) | 5.62 |
| Men:LA (2:1) | 0.21 |
| ChCl:AO (2:1) | 10.36 |

3.1.2 Solubilidade DES em soluções de polímero

A solubilidade destes DESs numa solução polimérica é essencial para a obtenção de fibras pela técnica de *electrospinning*, sendo esta uma possível forma de impregnar este tipo de solventes numa matriz sólida e permitir uma reutilização do solvente. Para tal foram testadas diferentes percentagens de DES em três soluções de polímero diferentes.

Para uma solução de 12% acetato celulose dissolvida em DMAc:acetona, nenhum dos DES preparados anteriormente foi miscível com a solução de polímero, tanto ao variar a percentagem como com aumento da temperatura, formando duas fases distintas. Os DESs quando testados numa solução de 15% acetato celulose dissolvida em ácido acético:água, apenas foi possível dissolver se a temperatura se encontrasse a 80 °C. Quando utilizada uma solução de 9% PVA em água, os DES foram miscíveis à temperatura ambiente, não sendo necessário aquecimento do meio.

A dimetilacetamida e a acetona são dois solventes apróticos polares, ao passo que a água e o ácido acético são dois solventes próticos polares, podendo ser uma razão plausível para os DES sintetizados serem miscíveis com solventes próticos, visto que este tipo de solventes têm um maior número de ligações O-H ou N-H, o que permite realizar ligações de hidrogénio com os DESs.

Deste modo, apenas foram utilizadas posteriormente na técnica de *electrospinning* soluções em que foi possível haver dissolução do DES com a solução polimérica. Contudo, nem todas as misturas de DES com solução polimérica foram testadas, tendo sido selecionados apenas alguns DES que, segundo a literatura, têm uma capacidade de solubilidade com CO₂, tornando-se mais fácil comparar estes com resultados obtidos na presente tese.

3.1.3 FTIR

A técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier permite uma caracterização química dos DES selecionados, podendo verificar-se as vibrações das ligações químicas do composto.

O espectro de IV do DES ChCl:Ureia (1:2) está representado na Figura 3.1.1, assim como o espectro de IV de cada componente constituinte do mesmo, o cloreto de colina e a ureia. Verifica-se que o espectro do DES corresponde, em grosso modo, a uma sobreposição dos espectros de cada um dos seus constituintes.

As bandas associadas ao cloreto de colina, ρ CH₃, ρ CH₂, ν_{as} CCO e δ CH, continuam presentes no espectro de IV do ChCl:Ureia, correspondendo respetivamente aos comprimentos de onda, 1435 cm⁻¹, 1083 cm⁻¹, 953 cm⁻¹ e 520 cm⁻¹, revelando que a estrutura do ião Ch⁺ não é destruído no solvente eutético. As bandas de absorção da ureia a 3429 cm⁻¹ e 3328 cm⁻¹, que podem ser atribuídos aos modos de elongação da ligação -NH₂ (ν_{as} NH₂ e ν_s NH₂), movem-se para comprimentos de onda mais baixos, 3317 cm⁻¹ e 3209 cm⁻¹, e tornam-se bandas mais largas. Estas alterações podem ser atribuídas à formação de mais ligações de hidrogénio entre a ureia e o ChCl. [84], [85] As ligações de hidrogénio podem existir como N-H...H-N, N-H...O-H, H-O...H-O e O-H...N-H. A formação de ligações de hidrogénio mais fortes faz com que as bandas de deformação observadas no espectro da ureia, δ_s NH₂ a 1674 cm⁻¹ e δ_{as} NH₂ a 1608 cm⁻¹, apesar desta última ser pouco visível, mudem para comprimentos de onda mais baixos no espectro do DES, a 1622 cm⁻¹ e 1604 cm⁻¹, respetivamente, sendo estes de maior intensidade e definição no espectro do ChCl:ureia. [84]

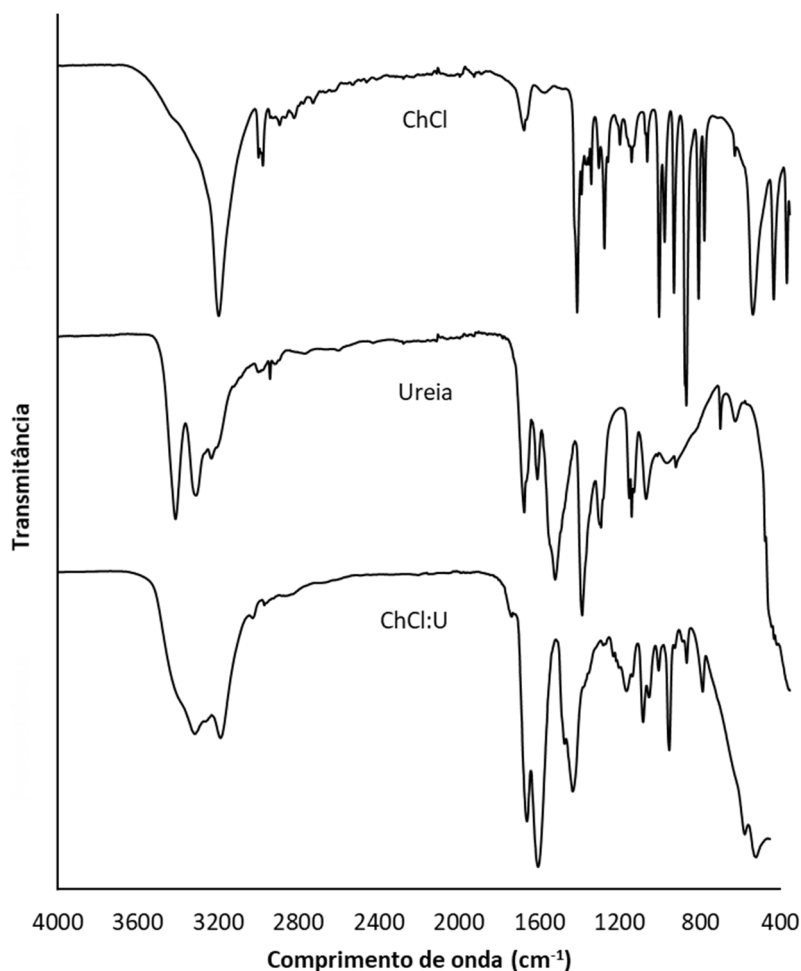


Figura 3.1.1 – Espectros de FTIR do ChCl:Ureia (1:2) e de cada componente que o constitui, a ureia e o cloreto de colina.

A Figura 3.1.2 mostra os espectros de FTIR do ChCl, do glicerol e do solvente eutético formado com estes dois, o ChCl:glicerol numa proporção 1:2. No espectro de FTIR do glicerol, que é o dador de ligações de hidrogénio do DES ChCl:Glicerol (1:2), observa-se uma banda larga a 3278 cm^{-1} atribuída à vibração da elongação da ligação O–H e as bandas nos comprimentos de onda 2934 e 2881 cm^{-1} correspondem às vibrações de elongação da ligação C–H.

As bandas correspondentes às vibrações de elongação do C–O aparecem a comprimentos de onda iguais a 1031 e 1108 cm^{-1} e a banda da vibração de elongação da ligação C–OH corresponde a um comprimento de onda de 922 cm^{-1} . Para o aceitador de ligações de hidrogénio, o cloreto de colina, uma banda forte da vibração de elongação

da ligação O–H e da vibração de deformação da ligação CH₂ aparecem a 3222 e 1482 cm⁻¹, respetivamente.^[86]

No espectro de FTIR do DES ChCl:Glicerol (1:2) é possível observar as bandas características do glicerol, em que a banda a cerca de 3294 cm⁻¹ pode ser atribuída à vibração de alongação do O–H, que está presente tanto no cloreto colina como no glicerol, enquanto que as bandas numa zona de comprimentos de onda baixos podem ser atribuídos à formação de fortes ligações de hidrogénio entre o ChCl e o glicerol. Muitas das bandas que são observadas no espectro de FTIR do cloreto colina desaparecem no espectro do DES, devido à destruição da estrutura cristalina do cloreto de colina.^[86]

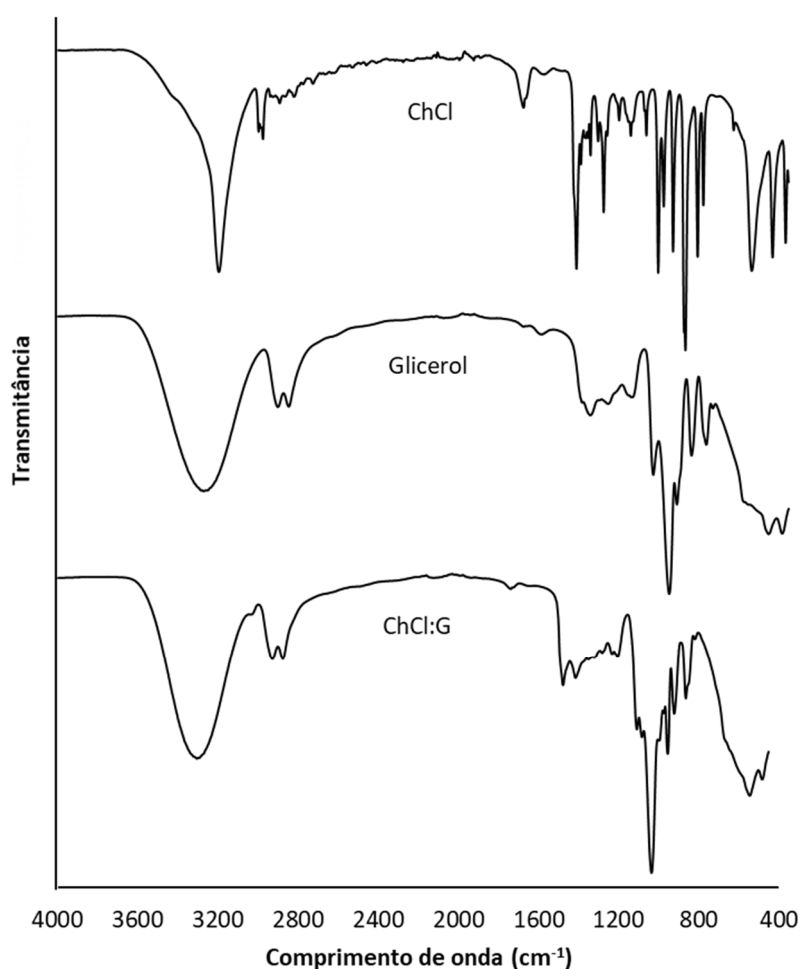


Figura 3.1.2 – Espectros de FTIR do ChCl:glicerol (1:2) e de cada componente que o constitui, o glicerol e o cloreto de colina.

3.2 Reologia de solventes eutécticos e soluções poliméricas

Como referido anteriormente, nem todos os DES foram utilizados na mistura polimérica para produção de fibras, tendo sido escolhidos dois DES, o cloreto de colina/ureia (1:2) e cloreto de colina/glicerol (1:2). Estes para além de medida o conteúdo de água foram caracterizados quanto à sua viscosidade.

É importante estudar a viscosidade dos DESs devido às interações que estes têm com a água, em que uma maior percentagem de água diminui a viscosidade do DES^[87] e por esta característica também influencia na solubilidade com CO₂, pois esta influencia na transferência de massa e de calor entre o DES e o CO₂,^[53] ou na obtenção de *electrospinning*.

As medições de viscosidade foram obtidas pela representação gráfica de viscosidade (Pa.s) vs taxa de cisalhamento (s⁻¹). Na Figura 3.2.1, apresentam-se os resultados obtidos para os DES, ChCl:glicerol e ChCl:ureia.

A viscosidade permanece constante em ambos os casos durante a variação da taxa de corte entre os 0.1 e 1000 s⁻¹, sendo possível afirmar que ambos os DES têm um comportamento fluídos newtonianos. O ChCl:ureia (1:2) exhibe uma viscosidade igual a 0.82±0.05 Pa.s, porém o ChCl:Glicerol apresenta uma menor viscosidade, igual a 0.32±0.01 Pa.s. O conteúdo de água deste DES, como se pode verificar na Tabela 3.1.1.1, é maior que no ChCl:ureia que influencia a viscosidade da solução.

A viscosidade também diminui com o aumento do número de cadeias de carbono e de cloreto de colina, quanto maior o valor da massa molar de um HBD (glicerol e ureia) menor será a viscosidade do DES.^[88] O glicerol tem uma maior capacidade de interação do que a ureia, deste modo a viscosidade do DES ChCl:glicerol é menor que a do DES ChCl:ureia.

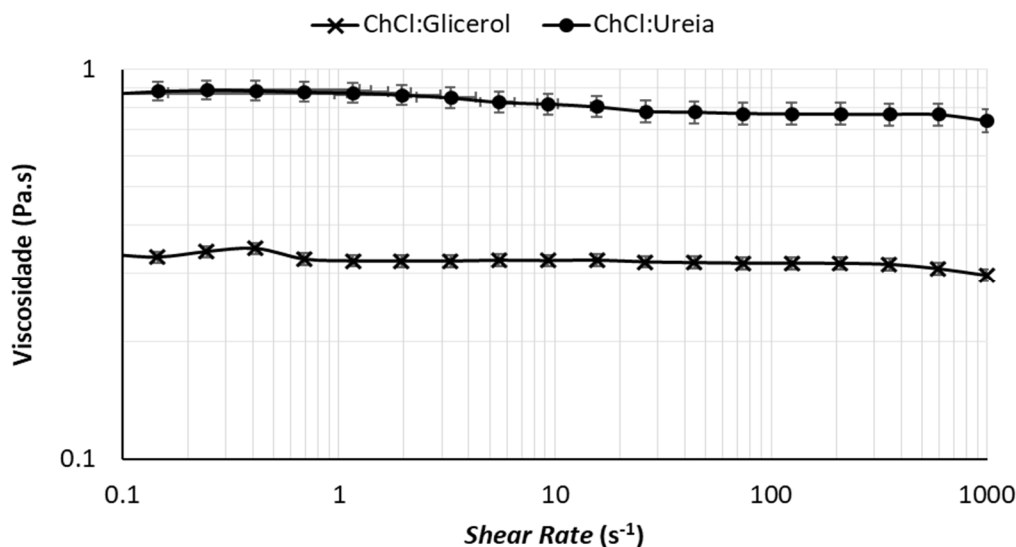


Figura 3.2.1 - Curvas de fluxo obtidas para os DES estudados, ChCl:Glicerol (1:2) - x e ChCl:Ureia (1:2) - ●.

Devido à importância da viscosidade na técnica de *electrospinning* foi estudada esta característica mecânica das soluções poliméricas que foram aplicadas na geração de fibras. As soluções aqui examinadas foram: 9% PVA em água, 9% PVA em água com 0.5% ChCl:Ureia e 9% PVA em água com 2% ChCl:Ureia. Esta forma permite perceber se a adição de um solvente eutético altera ou não a viscosidade do meio polimérico.

A curva de fluxo (viscosidade vs *shear rate*) determinada está exibida na Figura 3.2.2, permitindo conhecer os valores de viscosidade para cada uma das soluções investigadas. Para uma solução apenas de PVA obteve-se um valor de 0.58 ± 0.03 Pa.s, obtendo-se valores mais baixos quando adicionado o DES ao meio, com uma percentagem de 0.5% (v/v) de ChCl:Ureia o valor conseguido foi de 0.38 ± 0.02 Pa.s e com 2% (v/v) de ChCl:Ureia de 0.45 ± 0.05 Pa.s.

Assim, verifica-se que apesar da viscosidade do DES ChCl:ureia (1:2) ser maior que a própria solução de PVA, quando o primeiro é adicionado ao meio diminui a sua viscosidade. Estes resultados não apresentam uma correlação entre a viscosidade da solução e a quantidade de DES, no entanto em todos os casos estudados na presença de DES este apresenta um efeito plastificante, ou seja, diminui a viscosidade do meio.

As soluções aqui analisadas demonstram um comportamento típico de um fluido newtoniano, para a gama de taxas de corte estudadas, pois a viscosidade permanece constante com o aumento da taxa de cisalhamento.

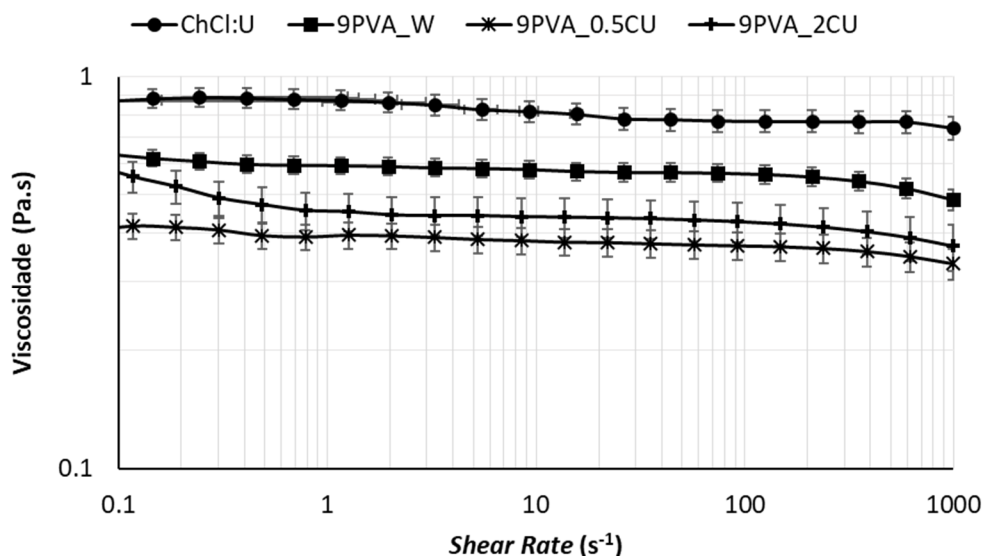


Figura 3.2.2 – Curva de fluxo das soluções analisadas. ChCl:U – ChCl:Ureia (1:2); 9PVA_W – 9% PVA em água; 9PVA_0.5CU – 9% PVA em água com 0.5% (v/v) ChCl:Ureia; 9PVA_2CU – 9% PVA em água com 2% (v/v) ChCl:Ureia.

3.3 *Electrospinning*

Inicialmente, o polímero selecionado para a obtenção de membranas de fibras com solventes eutéticos foi o acetato de celulose. Com este polímero foi possível obter fibras de 12% (w/v) acetato celulose em DMAc:acetona, utilizando parâmetros de *electrospinning* em que a obtenção de membranas de fibras com uma boa morfologia, segundo bibliografia consultada, que observadas apenas ao microscópio óptico aparentavam ter uma boa qualidade morfológica (Figura 3.3.1).

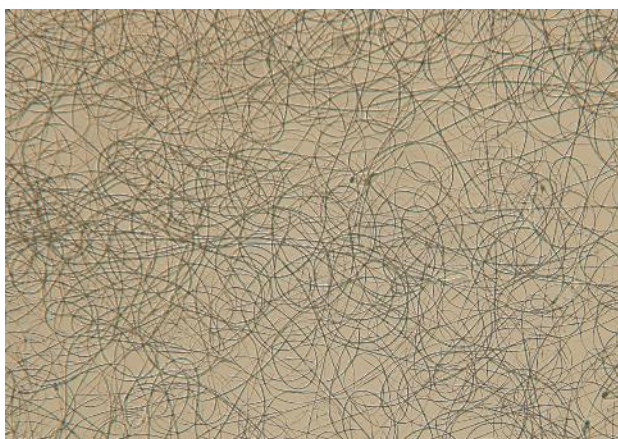


Figura 3.3.1 – Fibras observadas ao microscópio de 12% (w/v) acetato celulose em DMAc:Acetona (70:20).

Uma vez que apenas foi possível dissolver solventes eutéticos quando utilizado o acetato de celulose em mistura de ácido acético e água numa proporção 75:25 (v/v), a

solução anterior foi descartada e procedeu-se à obtenção de fibras com 2% (v/v) ChCl:Ureia (1:2) numa solução de polímero de 15% (w/v) acetato celulose em ácido acético:água. Com as condições de *electrospinning* adequadas foi possível obter uma membrana de fibras. A membrana obtida foi analisada quanto à sua morfologia pela técnica de microscopia eletrónica (SEM).

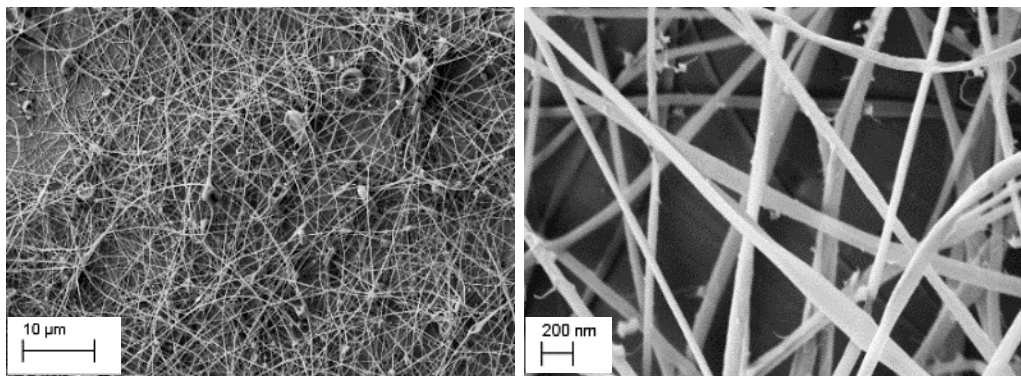


Figura 3.3.2 – Imagens SEM de uma membrana de fibra obtida por *electrospinning* de 15% CA em ácido acético:água com 2% ChCl:Ureia, com as condições descritas na Tabela 2.2.9.3 – Condições de *electrospinning* utilizadas para diferentes soluções., com duas aproximações de zoom diferentes.

Verificando as imagens obtidas por SEM (Figura 3.3.2), a morfologia das fibras não é perfeita existindo contas na sua formação, isto é, deformações das fibras provocadas pelas condições de *electrospinning* ou da própria solução. A formação de contas poderá ser justificada pela utilização de uma concentração não adequada, elevada tensão superficial ou uma baixa voltagem.

Tentou-se realizar novas abordagens com esta solução com novos parâmetros e uma concentração tanto de DES como de polímero mais baixas, mas foi impossível obter fibras. Devido a este insucesso e incapacidade de reproduzir fibras com as condições anteriores, a solução de polímero utilizada foi alterada para uma com capacidade de dissolver os DESs, sendo esta uma solução de 9% PVA em H₂O.

A literatura mostra que é possível obter membranas de fibras de PVA com diferentes concentrações de PVA em solução^[71], assim como com diferentes percentagens de PVA hidrolisado^[89] que podem afetar a formação de fibras. Neste trabalho foi utilizada uma percentagem de 9% PVA em água, sendo este 95% hidrolisado. Com as condições utilizadas para a obtenção da membrana de fibra de 9% PVA em H₂O, foi possível a formação de fibras com uma morfologia lisas e uniformes, como se pode notar na Figura 3.3.3.

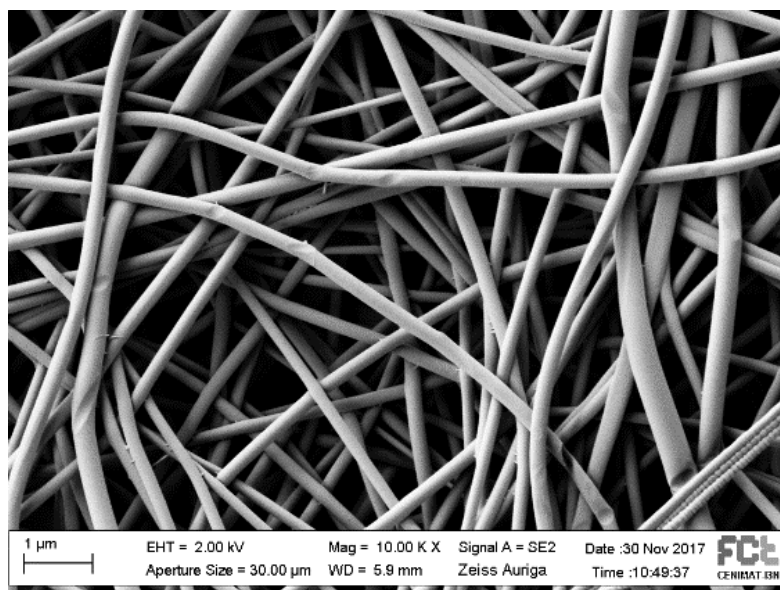


Figura 3.3.3 – Membrana de fibra de 9% PVA em H₂O, observada em microscópio eletrônico, obtida com as seguintes condições de *electrospinning*: T_a=24 °C, Humidade=41-43 %, Flow rate=0.2 ml/h, Voltagem= 17.5 kV e distância entre a agulha e o coletor=12 cm

Sendo possível a adição de solventes eutéticos a esta solução polimérica, recorreu-se novamente à técnica de *electrospinning* para obtenção de membranas com 2% (v/v) de ChCl:ureia e 2% (v/v) de ChCl:glicerol. A utilização dos solventes eutéticos não afetou a capacidade de obtenção de membranas de fibras, no entanto com as condições aplicadas apenas foi possível electrofiar, sem a presença de deformações, quando utilizada o DES ChCl:ureia. A morfologia destas membranas foi observada, tal como anteriormente, pelo microscópio eletrônico, onde as imagens recolhidas podem ser examinadas na Figura 3.3.4.

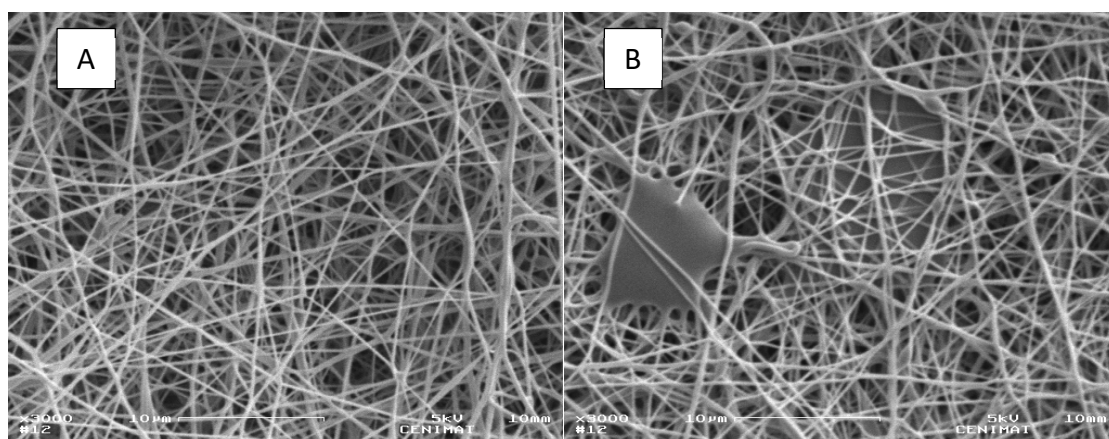


Figura 3.3.4 – Imagens de SEM de duas membranas de fibra obtidas com 9% PVA em água diferindo no DES utilizado. Em (A) foi usado 2% (v/v) ChCl:ureia, enquanto que em (B) foi utilizado 2% (v/v) ChCl:glicerol.

Apesar de ser possível obter fibras com 2% de ChCl:Ureia, testou-se também uma menor percentagem deste DES no meio polimérico de modo a analisar em que medida a quantidade de DES presente poderia ou não prejudicar a obtenção de fibras por *electrospinning*. A solução de 9% de PVA em água com 0.5% (v/v) de ChCl:Ureia foi então electrofiada, obtendo-se uma membrana de fibra.

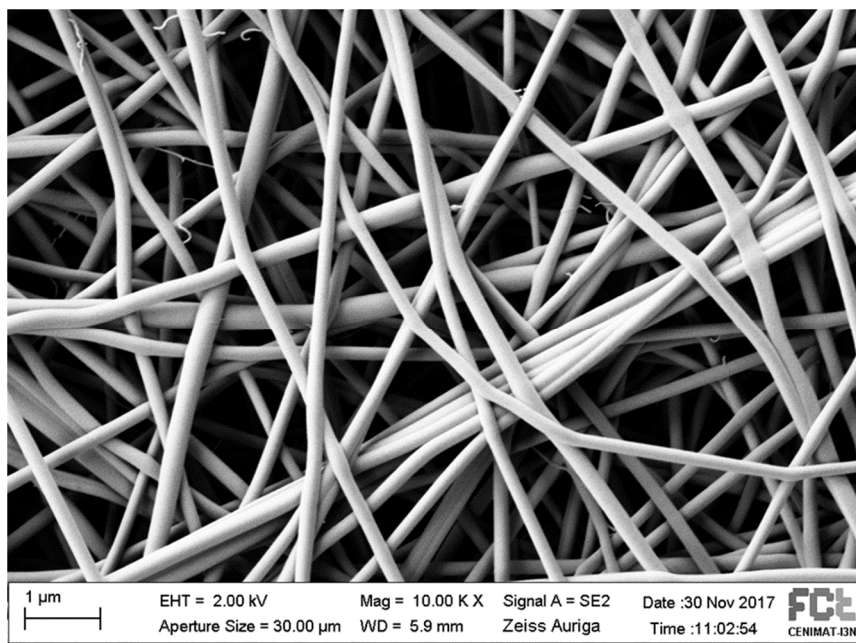


Figura 3.3.5 – Imagem de SEM de uma fibra constituída por 9% (w/v) PVA em água com 0.5% (v/v) ChCl:Ureia

Novamente, a morfologia da membrana de fibra obtida foi observada pelo microscópio eletrónico como se pode observar na Figura 3.3.5. Esta membrana morfologicamente não apresenta grandes diferenças em relação à com uma maior percentagem de DES, apesar disso as condições a que foi gerada varia em alguns parâmetros.

A membrana de fibra de 9% PVA com 0.5% ChCl:Ureia, foi escolhida para ser caracterizada mais pormenorizadamente por técnicas de caracterização mecânica, física e química. Para estas caracterizações foi necessário a reprodução de membranas com as mesmas características. O *electrospinning* é uma técnica bastante sensível, que com algumas mudanças meteorológicas afetam a temperatura e a humidade do meio em que está inserido, assim o ajuste destes dois parâmetros nem sempre foi conseguido, tornando mais difícil a realização da técnica, acontecendo lançamento de gotas ao longo

da eletrofiação e por vezes com humidade acima de 50% causar rugosidades na membrana formada.

Esta técnica também permitiu imobilizar a enzima anidrase carbónica, através da formação de uma membrana de fibra de uma solução 9% PVA (w/v) em H₂O com 0.5% (v/v) de ChCl:Ureia (1:2) à qual foi adicionada enzima com uma concentração de 0.5 mg/mL. A imobilização da enzima numa fibra possibilita uma possível reutilização da mesma, sendo a enzima um material caro. A eletrofiação desta solução foi possível, sem grandes alterações de parâmetros em relação a uma fibra sem enzima, revelando que a presença da enzima no meio não prejudicou o processo de eletrofiação.

3.3.1 Caracterização das Fibras de PVA

3.3.1.1 FTIR

A técnica de FTIR é utilizada na caracterização das fibras de modo a verificar se está presente DES na fibra sintetizada.

O espectro da fibra de PVA representado na Figura 3.3.6 apresenta uma banda vibracional da ligação de hidrogénio (vOH), a 3322 cm⁻¹ e uma banda característica da vibração de alongação das ligações C-H dos grupos alquilo a 2940 cm⁻¹. [88]

A análise de FTIR permite comparar o espectro de uma fibra de apenas PVA com o de uma fibra com 0.5% (v/v) de DES ChCl:Ureia adicionado, sendo quase impercetível ver alterações entre os dois espectros. Quando presente uma maior percentagem de DES (2% (v/v) ChCl:U), o espectro apresenta bandas características do próprio DES. No espectro da fibra de PVA com 2% (v/v) de DES é possível observar um aparecimento de uma elevação na banda na região dos 3200 cm⁻¹ correspondendo à banda da vibração da ν_s NH₂, que no espectro de ChCl:ureia está presente a 3209 cm⁻¹, assim como as bandas correspondentes às vibrações de deformação da ligação NH₂ a 1628 cm⁻¹ e 1666 cm⁻¹, presentes no espectro da fibra. O aparecimento destas bandas vibracionais indicam que nesta membrana de fibra está presente na sua constituição o DES ChCl:Ureia. Quando apenas está presente 0.5% (v/v) de ChCl:ureia na membrana de fibra está é uma pequena percentagem para ser detetada pela técnica de FTIR, sendo necessário utilizar outras tipo de técnicas de caracterização para compreender se o DES está presente.

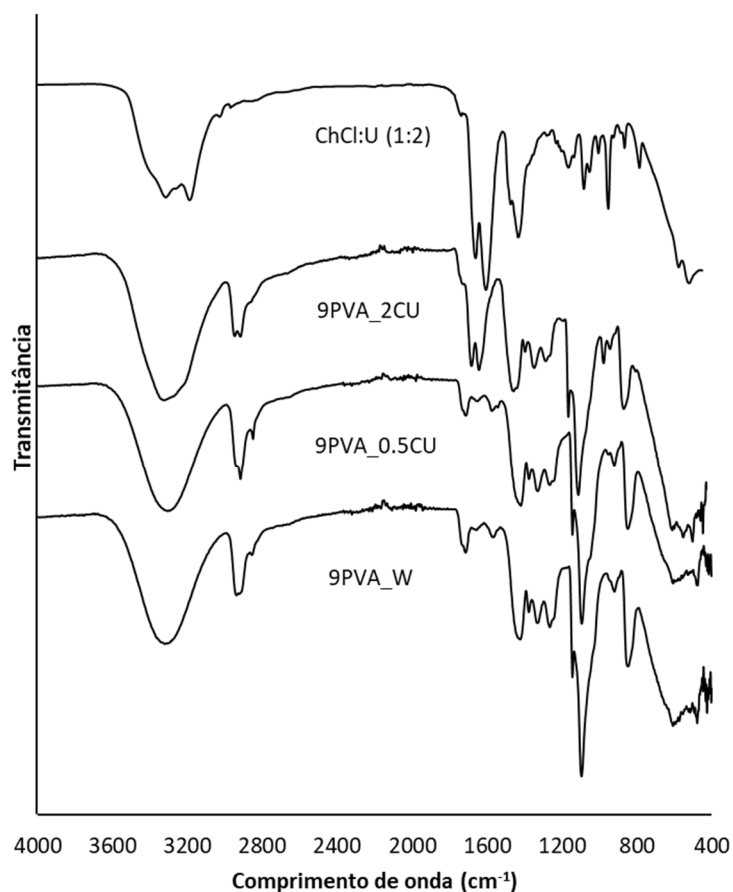


Figura 3.3.6 – Espectros de FTIR-ATR obtidos pela análise de amostras de fibras de 9 % (w/v) PVA, 9% PVA e 0.5% (v/v) ChCl:Ureia e também com 2% deste mesmo DES.

3.3.1.2 Ensaios de tração

As propriedades mecânicas das fibras foram realizadas no modo de tração. Esta técnica permitiu informar em que medida a presença de DES influencia a elasticidade das fibras. A Figura 3.3.7 apresentam-se as curvas de tração obtidas nos ensaios de tração realizados para uma fibra de 9% (w/v) PVA em água e uma fibra de 9% (w/v) PVA em água com 0.5% (v/v) ChCl:ureia (1:2).

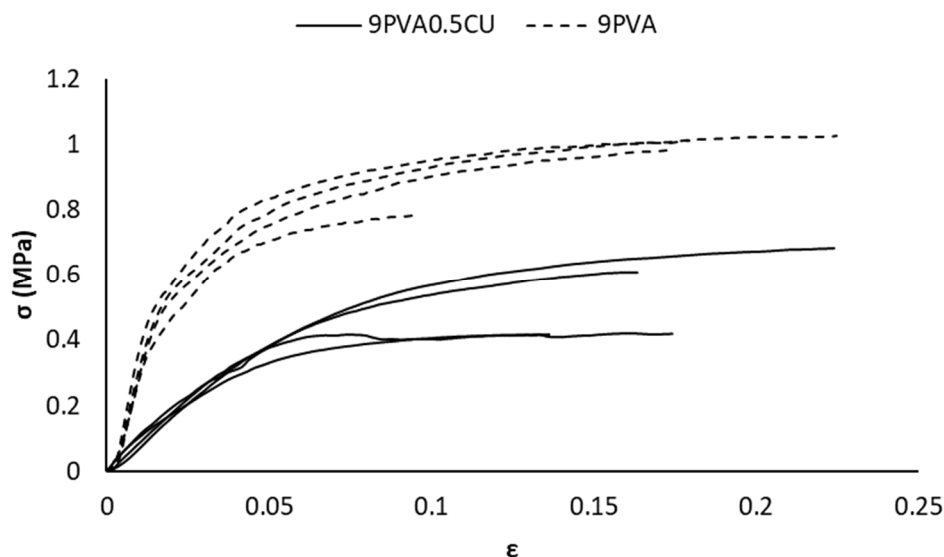


Figura 3.3.7 – Curvas de tração obtidas para as amostras de fibras 9% (w/v) PVA em água (9PVA) e 9% (w/v) PVA em água com 0.5% (v/v) ChCl:ureia (1:2) (9PVA0.5CU).

Na Tabela 3.3.1.1 representa-se os resultados obtidos do módulo de Young, tensão de rutura e ductilidade para as fibras produzidas.

Tabela 3.3.1.1 – Resultados obtidos dos ensaios mecânicos realizados com as fibras obtidas.

| Amostra | Módulo de Young (MPa) | Tensão de Rutura (MPa) | Ductilidade (%) |
|--------------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------|
| PVA 9% (w/v) | 30 | 0.95±0.11 | 17.44±3.67 |
| PVA 9% (w/v) + 0.5% (v/v) ChCl:Ureia | 7.5±0.58 | 0.53±0.14 | 17.04±5.86 |

De notar que quando existe DES no meio este diminui quer o módulo de Young quer a tensão de rutura, fornecendo a informação que a presença de DES pode aumentar a mobilidade da cadeia do polímero e promover um efeito plastificante. Segundo a literatura, este comportamento foi anteriormente observado na junção de polímeros com líquidos iónicos.^[90]

3.4 Atividade Enzimática da Anidrase Carbónica

A anidrase carbónica é uma enzima que no presente estudo tem a função de tornar a captura/conversão de CO_2 mais eficiente quando encapsulada na fibra. Esta enzima é solúvel em ChCl :Ureia e também numa solução de PVA com uma pequena percentagem deste mesmo DES. Apesar de ser solúvel foi necessário perceber se esta permanece ativa quando encapsulada na enzima. Assim foi medida a atividade enzimática desta enzima por dois métodos, o método de Wilbur-Anderson, baseando-se no tempo necessário para que o pH do meio passe de 8.3 para 6.3 e pelo método colorimétrico de medição da atividade da esterase, pois o centro ativo da anidrase carbónica é também responsável pela hidrólise de ésteres.

3.4.1 Método de Wilbur-Anderson

Com este método foi apenas estudada se na presença das concentrações utilizadas nas de ChCl :Ureia em tampão Tris-HCl existe ou não atividade da enzima anidrase carbónica. Através do tempo da variação do pH de 8.3 para 6.3 obteve-se os resultados apresentados na Figura 3.4.1.

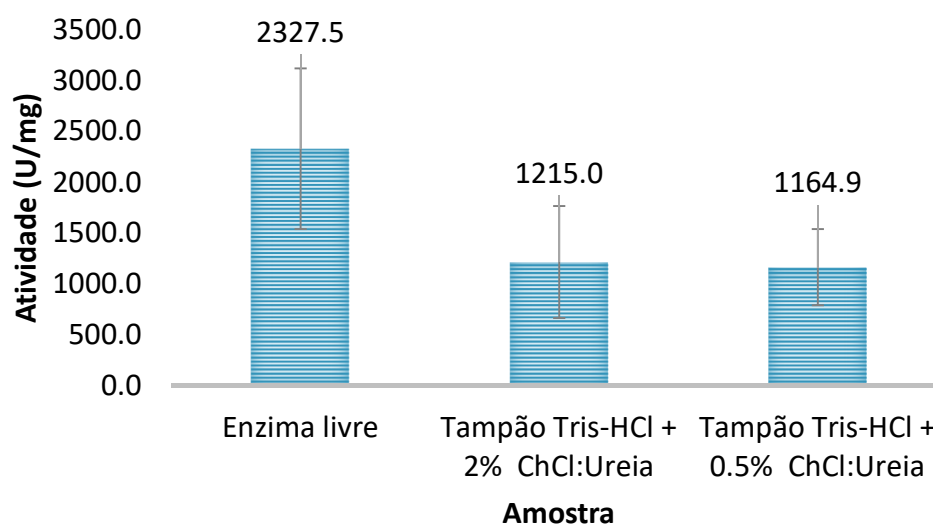


Figura 3.4.1 – Atividade enzimática da anidrase carbónica quando livre e quando presente 2% e 0.5% (v/v) de ChCl :Ureia (1:2) dissolvido em tampão Tris-HCl.

Segundo estes resultados, a enzima vai tornando-se menos ativa quando o DES se encontra presente na solução de tampão Tris-HCl. Apesar de se poder tirar esta

conclusão destes valores, a reprodutibilidade deste ensaio traz bastantes incertezas, uma vez que quando um ensaio é repetido os valores obtidos do tempo para o decaimento do pH não são concordantes e muitas das vezes os valores de pH obtidos variam para valores mais baixos e muito mais altos quando utilizada o mesmo tipo de solução. A credibilidade deste ensaio, em outros estudos já tinha sido discutida, Mirjafaria *et. al* investigaram a hidratação do CO₂ com o uso da anidrase carbónica livre e apenas conseguiram obter dados numa gama de pH entre 2 e 4 e com intervalos de tempo iguais a 3 segundo, limitando a amostragem. Semelhantemente, Bond *et al.*, verificaram que o decaimento do pH ocorria gradualmente em menos de 25 s. Deste modo a atividade enzimática estimada com este tipo de dados traz largas incertezas.^[91]

Da mesma forma, quando utilizada esta técnica para o estudo enzimático na fibra os resultados foram inconclusivos, pois em primeiro lugar a fibra não é uniforme e a amostra recolhida para o ensaio pode não ter a mesma quantidade da enzima que noutro local da membrana, não sendo possível saber a quantidade de enzima presente em cada amostra não podendo ser calculado o valor da atividade.

3.4.2 Método colorimétrico – Atividade da esterase

O método descrito anteriormente apresenta algumas limitações, tornando a quantificação da atividade enzimática mais difícil. Foi paralelamente utilizado método colorimétrico para a determinação da atividade da anidrase carbónica livre e imobilizada em fibra através da determinação da atividade da esterase. Ao utilizar como substrato o p-NPA para este tipo de ensaio, foi possível obter resultados experimentais com reprodutibilidade.

Neste ensaio foi utilizada uma membrana de fibra obtida com as condições já descritas com 0.5 mg/mL de enzima. Esta membrana tem cerca de 0.7 mL de solução electrofiada.

Os resultados obtidos de atividade na enzima livre foi de 1690±20 U e quando imobilizada foi de 1033.3±385.9 U. Assim pode-se concluir que quando imobilizada a enzima continua ativa, mas perde atividade neste meio. Esta perda de atividade pode

ser devida ao se lavar a fibra com tampão e não se saber qual a concentração exata presente.

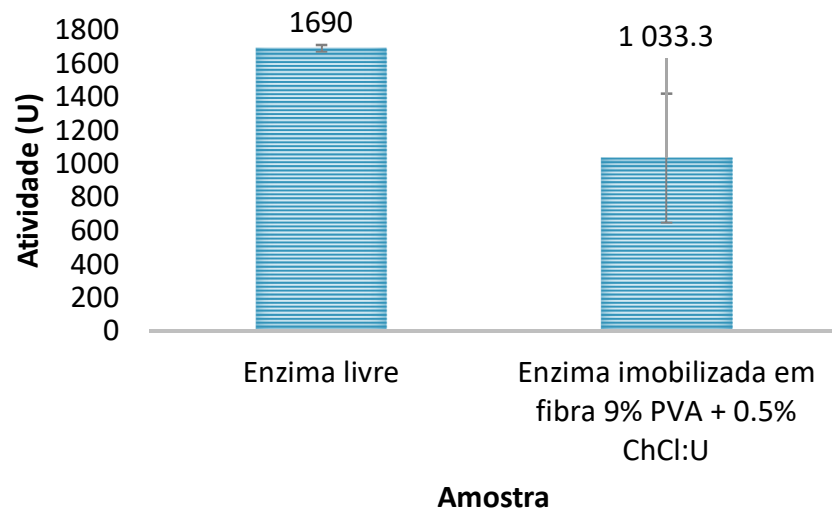


Figura 3.4.2 – Atividade enzimática da esterase na enzima anidrase carbónica, quando livre numa concentração 0.5 mg/ml e quando imobilizada numa fibra com DES.

4 CONCLUSÃO

Apesar de não ter sido estudada a solubilidade de CO₂ em diferentes de DESs, o trabalho desenvolvido na presente tese teve sucesso, tendo sido possível um procedimento que permitiu a electrofiação de soluções de polímero com solventes eutéticos capazes de capturar CO₂, cumprido deste modo um dos objetivos principais, ou seja, a obtenção de material tridimensional com a impregnação de DES. A utilização do acetato celulose como polímero não permitiu reproduzir membranas, levando à procura de um novo polímero, o PVA, possibilitando a realização de *electrospinning* para formação de membranas de fibras com parâmetros que não influenciaram significativamente a morfologia das fibras, tanto numa solução em estado “puro” como numa solução com DES imobilizado. Esta mesma técnica permitiu que o encapsulamento de uma enzima capaz de tornar o processo de captura/conversão de CO₂ mais eficiente.

A caracterização destas mesmas fibras de PVA e PVA com diferentes concentração de DES, levaram a concluir que a presença de um DES, como o ChCl:ureia (1:2) pode influenciar a elasticidade da fibra, verificando-se um módulo de Young menor quando presente. A presença de DES também diminui a viscosidade da solução polimérica, diminuindo mais a viscosidade quando a concentração de DES é menor, tendo este solvente um efeito plastificante.

O uso do DES revelou-se ser um agente prejudicial quando estudada a atividade enzimática da anidrase carbónica. Quanto maior a percentagem de DES em solução menor é atividade da enzima, acontecendo semelhantemente quando a enzima imobilizada na fibra de PVA com DES.

5 TRABALHO FUTURO

Como trabalho futuro, de modo a melhorar o estudo desenvolvido na presente tese e a fim de obter resultados válidos para o cumprimento do objetivo inicial, poderão ser usados outros métodos e técnicas para tal. Para uma melhor caracterização das soluções das fibras deveria estudar-se a densidade, tensão superficial e condutividade das soluções poliméricas e soluções finais com DES, utilizadas para *electrospinning*, uma vez que estes parâmetros têm bastante importância, influenciando a eletrofiação e a formação de contas durante este processo.

O estudo deveria alargar-se para outro tipo de soluções poliméricas, p.e. mudança de solventes e/ou polímero. A utilização do PVA como polímero no sistema captura de CO₂ de gases de combustão traz complicações, pois este polímero é hidrofílico e num gás de combustão existe a presença de vapor de água, que quando em contacto com uma membrana de fibra de PVA irá destruí-la. Como é possível obter fibras com este polímero, existem formas de o poder reticular ou tratar de forma a não se degradar na presença de água e poder ser reutilizado, deste modo procurar uma destas soluções poderia ser significativo para este estudo ao invés da substituição do polímero. Este tipo de tratamento também pode ajudar para que a enzima, sendo um material biológico caro, se mantenha dentro na fibra e não lixivie na presença de gases (p.e. vapor de água).

A captura de CO₂ deverá ser estudada nos DES utilizados assim como numa maior gama de DES, que apresentem um menor conteúdo de água, por exemplo solventes eutéticos com mentol, visto que este é hidrofóbico ou que não diminua a atividade da anidrase carbónica. Ensaio de captura de CO₂ a temperaturas não elevadas e pressões próximas da atmosférica com fibras e DES impregnado, assim como com a enzima são também essenciais para fundamentar se este tipo de membranas poderá ou não ter esta aplicação de captura de CO₂ de gases de combustão.

Para seguir de uma melhor forma a cinética de conversão de CO₂ com o uso da enzima anidrase carbónica é necessário desenvolver um método mais eficaz para este efeito.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] S. C. Ameta e R. Ameta, *Green Chemistry: Fundamentals and Applications*. CRC press, 2013.
- [2] P. T. Anastas e J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press, 1998.
- [3] P. T. Anastas e M. M. Kirchhoff, «Origins, current status, and future challenges of green chemistry», *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, n. 9, pp. 686–694, 2002.
- [4] P. Anastas e N. Eghbali, «Green Chemistry: Principles and Practice», *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, n. 1, pp. 301–312, 2010.
- [5] P. J. Dunn, «The importance of Green Chemistry in Process Research and Development», *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, n. 4, pp. 1452–1461, 2012.
- [6] D. M. D'Alessandro, B. Smit, e J. R. Long, «Carbon dioxide capture: Prospects for new materials», *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 49, n. 35, pp. 6058–6082, 2010.
- [7] «Visão | Sabes o que é o efeito de estufa?» [Em linha]. Disponível em: <http://visao.sapo.pt/visaojunior/temas/ambiente/sabes-o-que-e-o-efeito-de-estufa=f577750>. [Acedido: 10-Fev-2018].
- [8] «Global Greenhouse Gas Emissions Data | Greenhouse Gas (GHG) Emissions | US EPA». [Em linha]. Disponível em: <https://www.epa.gov/ghgemissions/global-greenhouse-gas-emissions-data#three>. [Acedido: 10-Fev-2018].
- [9] «The Greenhouse Effect». [Em linha]. Disponível em: http://earthguide.ucsd.edu/virtualmuseum/climatechange1/02_1.shtml. [Acedido: 10-Fev-2018].
- [10] H. Fashandi, A. Ghodsi, R. Saghafi, e M. Zarrebini, «CO₂ absorption using gas-liquid membrane contactors made of highly porous poly(vinyl chloride) hollow fiber membranes», *Int. J. Greenh. Gas Control*, vol. 52, pp. 13–23, 2016.
- [11] M. Isik, S. Zulfiqar, F. Edhaim, F. Ruiperez, A. Rothenberger, e D. Mecerreyes, «Sustainable Poly(Ionic Liquids) for CO₂ Capture Based on Deep Eutectic Monomers», *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 4, n. 12, pp. 7200–7208, 2016.
- [12] S. Sarmad, Y. Xie, J. Mikkola, e X. Ji, «Screening of deep eutectic solvents (DESs) as green CO₂ sorbents: from solubility to viscosity», *New J. Chem.*, vol. 41, pp. 290–301, 2017.
- [13] M. Wang, A. Lawal, P. Stephenson, J. Sidders, e C. Ramshaw, «Post-combustion CO₂ capture with chemical absorption: A state-of-the-art review», *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 89, n. 9, pp. 1609–1624, 2011.
- [14] T. C. Merkel, H. Lin, X. Wei, e R. Baker, «Power plant post-combustion carbon dioxide capture: An opportunity for membranes», *J. Memb. Sci.*, vol. 359, pp. 126–139, 2010.
- [15] J. C. M. Pires, F. G. Martins, M. C. M. Alvim-Ferraz, e M. Simões, «Recent developments on carbon capture and storage: An overview», *Chem. Eng. Res.*

- Des.*, vol. 89, n. 9, pp. 1446–1460, 2011.
- [16] X. Li, Y. Jiang, G. Han, e D. Deng, «Investigation of the Solubilities of Carbon Dioxide in Some Low Volatile Solvents and Their Thermodynamic Properties», *J. Chem. Eng. Data*, vol. 61, n. 3, pp. 1254–1261, 2016.
- [17] N. El Hadri, D. V. Quang, E. L. V Goetheer, e M. R. M. Abu Zahra, «Aqueous amine solution characterization for post-combustion CO₂ capture process», *Appl. Energy*, vol. 185, pp. 1433–1449, 2017.
- [18] A. Uma Maheswari e K. Palanivelu, «Carbon Dioxide Capture and Utilization by Alkanolamines in Deep Eutectic Solvent Medium», *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 54, n. 45, pp. 11383–11392, 2015.
- [19] N. El Hadri, D. V. Quang, E. L. V Goetheer, e M. R. M. Abu Zahra, «Aqueous amine solution characterization for post-combustion CO₂ capture process», *Appl. Energy*, vol. 185, pp. 1433–1449, Jan. 2017.
- [20] F. Chemat, N. Gnanasundaram, A. M. Shariff, e T. Murugesan, «Effect of L-arginine on Solubility of CO₂ in Choline Chloride + Glycerol Based Deep Eutectic Solvents», *Procedia Eng.*, vol. 148, pp. 236–242, 2016.
- [21] H. Yang, Z. Xu, M. Fan, R. Gupta, R. B. Slimane, A. E. Bland, e I. Wright, «Progress in carbon dioxide separation and capture: A review», *J. Environ. Sci.*, vol. 20, n. 1, pp. 14–27, 2008.
- [22] S. Choi, J. H. Drese, e C. W. Jones, «Adsorbent materials for carbon dioxide capture from large anthropogenic point sources», *ChemSusChem*, vol. 2, n. 9, pp. 796–854, 2009.
- [23] M. E. Boot-Handford, J. C. Abanades, E. J. Anthony, M. J. Blunt, S. Brandani, N. Mac Dowell, J. R. Fernández, M.-C. Ferrari, R. Gross, J. P. Hallett, R. S. Haszeldine, P. Heptonstall, A. Lyngfelt, Z. Makuch, E. Mangano, R. T. J. Porter, M. Pourkashanian, G. T. Rochelle, N. Shah, J. G. Yao, e P. S. Fennell, «Carbon capture and storage update», *Energy Environ. Sci.*, vol. 7, n. 1, pp. 130–189, 2014.
- [24] L. A. Neves, C. Afonso, I. M. Coelho, e J. G. Crespo, «Integrated CO₂ capture and enzymatic bioconversion in supported ionic liquid membranes», *Sep. Purif. Technol.*, vol. 97, pp. 34–41, 2012.
- [25] E. S. Rubin, H. Mantripragada, A. Marks, P. Versteeg, e J. Kitchin, «The outlook for improved carbon capture technology», *Prog. Energy Combust. Sci.*, vol. 38, n. 5, pp. 630–671, Out. 2012.
- [26] A. Brunetti, F. Scura, G. Barbieri, e E. Drioli, «Membrane technologies for CO₂ separation», *J. Memb. Sci.*, vol. 359, pp. 115–125, 2010.
- [27] S. Basu, A. Cano-Odena, e I. F. J. Vankelecom, «MOF-containing mixed-matrix membranes for CO₂/CH₄ and CO₂/N₂ binary gas mixture separations», *Sep. Purif. Technol.*, vol. 81, n. 1, pp. 31–40, Set. 2011.
- [28] J.-R. Li, Y. Ma, M. C. McCarthy, J. Sculley, J. Yu, H.-K. Jeong, P. B. Balbuena, e H.-C. Zhou, «Carbon dioxide capture-related gas adsorption and separation in metal-organic frameworks», *Coord. Chem. Rev.*, vol. 255, pp. 1791–1823, 2011.
- [29] S. Keskin, D. Kayrak-Talay, U. Akman, e Ö. Hortaçsu, «A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications», *J. Supercrit. Fluids*, vol. 43, n. 1, pp. 150–180, 2007.
- [30] Z. Yang e W. Pan, «Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis»,

- Enzyme Microb. Technol.*, vol. 37, n. 1, pp. 19–28, 2005.
- [31] J. F. Brennecke e E. J. Maginn, «Ionic liquids: Innovative fluids for chemical processing», *AIChE J.*, vol. 47, n. 11, pp. 2384–2389, 2001.
 - [32] C. H. Yu, C. H. Huang, e C. S. Tan, «A review of CO₂ capture by absorption and adsorption», *Aerosol Air Qual. Res.*, vol. 12, n. 5, pp. 745–769, 2012.
 - [33] A. Vioux, L. Viau, S. Volland, e J. Le Bideau, «Use of ionic liquids in sol-gel; ionogels and applications», *Comptes Rendus Chim.*, vol. 13, n. 1–2, pp. 242–255, 2010.
 - [34] M. Hasib-ur-Rahman, M. Siaj, e F. Larachi, «Ionic liquids for CO₂ capture-Development and progress», *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 49, n. 4, pp. 313–322, 2010.
 - [35] R. Prado e C. C. Weber, «Applications of Ionic Liquids», *Appl. Purification, Recover. Ion. Liq.*, vol. 12, pp. 1–58, 2016.
 - [36] T. P. Thuy Pham, C. W. Cho, e Y. S. Yun, «Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review», *Water Res.*, vol. 44, n. 2, pp. 352–372, 2010.
 - [37] E. I. Izgorodina, J. L. Hodgson, D. C. Weis, S. J. Pas, e D. R. MacFarlane, «Physical Absorption of CO₂ in Protic and Aprotic Ionic Liquids: An Interaction Perspective», *J. Phys. Chem. B*, vol. 119, n. 35, pp. 11748–11759, 2015.
 - [38] A. M. Pinto, H. Rodríguez, A. Arce, e A. Soto, «Combined physical and chemical absorption of carbon dioxide in a mixture of ionic liquids», *J. Chem. Thermodyn.*, vol. 77, pp. 197–205, 2014.
 - [39] S. Sarmad, J.-P. Mikkola, e X. Ji, «Carbon Dioxide Capture with Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents: A New Generation of Sorbents», *ChemSusChem*, vol. 10, n. 2, pp. 324–352, 2017.
 - [40] X. Zhang, X. Zhang, H. Dong, Z. Zhao, S. Zhang, e Y. Huang, «Carbon capture with ionic liquids: overview and progress», *Energy Environ. Sci.*, vol. 5, n. 5, p. 6668, 2012.
 - [41] F. Chemat, H. Anjum, A. M. Shariff, P. Kumar, e T. Murugesan, «Thermal and physical properties of (Choline chloride + urea + l-arginine) deep eutectic solvents», *J. Mol. Liq.*, vol. 218, pp. 301–308, 2016.
 - [42] Q. Zhang, K. De, O. Vigier, S. Royer, e F. Jeoe, «Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications», *Chem. Soc. Rev. Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, n. 41, pp. 7108–7146, 2012.
 - [43] S. R. F. ois J. ro[^] me Qinghua Zhang, Karine De Oliveira Vigier, «Deep eutectic solvents : syntheses, properties and applications», *Chem Soc Rev*, vol. 41, pp. 7108–7146, 2012.
 - [44] A. P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D. L. Davies, e R. Rasheed, «Deep Eutectic Solvents Formed Between Choline Chloride and Carboxylic Acids», *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, n. 9, p. 9142, 2004.
 - [45] E. L. Smith, A. P. Abbott, e K. S. Ryder, «Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications», *Chem. Rev.*, vol. 114, n. 21, pp. 11060–11082, 2014.
 - [46] U. G. Hoang Pham, H. Pham, e H. Chauhan, «Pharmaceutical Applications of Eutectic Mixtures», *J. Dev. Drugs*, vol. 2, n. 3, Set. 2013.
 - [47] A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, e V. Tambyrajah, «Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures», *Chem. Commun.*, n. 1, pp.

- 70–71, 2003.
- [48] C. Florindo, F. S. Oliveira, L. P. N. Rebelo, A. M. Fernandes, e I. M. Marrucho, «Insights into the Synthesis and Properties of Deep Eutectic Solvents Based on Cholinium Chloride and Carboxylic Acids», *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 2, n. 10, pp. 2416–2425, Out. 2014.
 - [49] H. G. Morrison, C. C. Sun, e S. Neervannan, «Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles», *Int. J. Pharm.*, vol. 378, n. 1–2, pp. 136–139, Ago. 2009.
 - [50] G. García, S. Aparicio, R. Ullah, e M. Atilhan, «Deep Eutectic Solvents: Physicochemical Properties and Gas Separation Applications», *Energy & Fuels*, vol. 29, n. 4, pp. 2616–2644, Abr. 2015.
 - [51] A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, M. Martins, R. L. Reis, e A. R. C. Duarte, «Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century», *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 2, n. 5, pp. 1063–1071, Mai. 2014.
 - [52] E. Ali, M. K. Hadj-Kali, S. Mulyono, I. Alnashef, A. Fakeeha, F. Mjalli, e A. Hayyan, «Solubility of CO₂ in deep eutectic solvents: Experiments and modelling using the Peng-Robinson equation of state», *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 92, n. 10, pp. 1898–1906, Out. 2014.
 - [53] S. Sarmad, Y. Xie, J.-P. Mikkola, e X. Ji, «Screening of deep eutectic solvents (DESs) as green CO₂ sorbents: from solubility to viscosity», *New J. Chem.*, vol. 41, n. 1, pp. 290–301, 2017.
 - [54] «h2g2 - The Applications of Enzymes in Industry and Medicine». [Em linha]. Disponível em: <https://h2g2.com/entry/A1125721>. [Acedido: 24-Fev-2018].
 - [55] J. da Costa Ores, L. Sala, G. P. Cerveira, e S. J. Kalil, «Purification of carbonic anhydrase from bovine erythrocytes and its application in the enzymic capture of carbon dioxide», *Chemosphere*, vol. 88, n. 2, pp. 255–259, 2012.
 - [56] J. K. J. Yong, G. W. Stevens, F. Caruso, e S. E. Kentish, «The use of carbonic anhydrase to accelerate carbon dioxide capture processes», *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 90, n. 1, pp. 3–10, 2015.
 - [57] M. Vinoba, M. Bhagiyalakshmi, A. N. Grace, D. H. Kim, Y. Yoon, S. C. Nam, I. H. Baek, e S. K. Jeong, «Carbonic Anhydrase Promotes the Absorption Rate of CO₂ in Post-Combustion Processes», *J. Phys. Chem. B*, p. 130426143016002, 2013.
 - [58] R. Dilmore, C. Griffith, Z. Liu, Y. Soong, S. W. Hedges, R. Koepsel, e M. Ataii, «Carbonic anhydrase-facilitated CO₂ absorption with polyacrylamide buffering bead capture», *Int. J. Greenh. Gas Control*, vol. 3, n. 4, pp. 401–410, 2009.
 - [59] L. Guangmin, Q. Lina, Z. Hong, X. Shumei, e Z. Dan, «ScienceDirect The capacity of bicarbonate capture of a continuous microalgae photo-bioreactor system», *Energy Procedia*, vol. 61, pp. 361–364, 2014.
 - [60] C. Prabhu, S. Wanjari, S. Gawande, S. Das, N. Labhsetwar, S. Kotwal, A. Kumar, T. Satyanarayana, e S. Rayalu, «Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Immobilization of carbonic anhydrase enriched microorganism on biopolymer based materials», vol. 60, pp. 13–21, 2009.
 - [61] D. Li e Y. Xia, «Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?», *Advanced Materials*. 2004.
 - [62] F. Mano, I. M. Aroso, S. Barreiros, J. P. Borges, R. L. Reis, A. R. C. Duarte, e A. Paiva,

- «Production of poly(vinyl alcohol) (PVA) fibers with encapsulated natural deep eutectic solvent (NADES) using electrospinning», *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 3, n. 10, pp. 2504–2509, 2015.
- [63] A. Greiner e J. H. Wendorff, «Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers», *Angewandte Chemie - International Edition*. 2007.
- [64] J. Doshi e D. H. Reneker, «Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers», *ELSEVIER J. Electrostat.*, vol. 35, pp. 151–160, 1995.
- [65] A. C. Baptista, I. Ferreira, e J. P. Borges, «Electrospun Applications Fibers in Composite Materials for Medical», pp. 56–65, 2014.
- [66] Z. Li e C. Wang, «One-Dimensional nanostructures», pp. 15–29, 2013.
- [67] Q. P. Pham, U. Sharma, e A. G. Mikos, «Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review», *Tissue Eng.*, vol. 0, n. 0, p. 60509065116001, 2006.
- [68] N. Bhardwaj e S. C. Kundu, «Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique», *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, n. 3, pp. 325–347, 2010.
- [69] W. E. Teo e S. Ramakrishna, «A review on electrospinning design and nanofibre assemblies», *Nanotechnology*, vol. 17, n. 14, 2006.
- [70] C. Shao, H. Y. Kim, J. Gong, B. Ding, D. R. Lee, e S. J. Park, «Fiber mats of poly(vinyl alcohol)/silica composite via electrospinning», *Mater. Lett.*, vol. 57, n. 9–10, pp. 1579–1584, 2003.
- [71] P. Supaphol e S. Chuangchote, «On the electrospinning of poly(vinyl alcohol) nanofiber mats: A revisit», *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 108, n. 2, pp. 969–978, Abr. 2008.
- [72] A. Koski, K. Yim, e S. Shivkumar, «Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning», *Mater. Lett.*, vol. 58, n. 3–4, pp. 493–497, 2004.
- [73] P. Bruttel e R. Schlink, «Water Determination by Karl Fischer Titration», *Metrohm*, n. 8.026.5003, p. 80, 2003.
- [74] «Fourier Transform Infrared Spectroscopy | FTIR Failure Analysis | FTIR Material Analysis». [Em linha]. Disponível em: <https://www.mee-inc.com/hamm/fourier-transform-infrared-spectroscopy-ftir/>. [Acedido: 17-Fev-2018].
- [75] Perkin Elmer, «ATR accessories: An overview». Technical Note, 2004.
- [76] M. Rosario Costa, M. Teresa Santos, e T. Cunha Diamantino, «FTIR, a powerful technique in organic coating failure diagnosis», *Corros. Prot. Mater. Corros. Prot. Mater.*, vol. 30, n. 2, pp. 57–64, 2011.
- [77] «Scanning Electron Microscopy (SEM)». [Em linha]. Disponível em: https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html. [Acedido: 18-Fev-2018].
- [78] «Tension and Compression Testing | Tension and Compression Failure Analysis | Tension and Compression Material Analysis | ToF-SIMS». [Em linha]. Disponível em: <https://www.mee-inc.com/hamm/tension-and-compression-testing/>. [Acedido: 22-Fev-2018].
- [79] «Tensile Testing - Instron». [Em linha]. Disponível em: <http://www.instron.us/en-us/our-company/library/test-types/tensile-test>. [Acedido: 22-Fev-2018].

- [80] «Viscosity». [Em linha]. Disponível em: <https://www.saylor.org/site/wp-content/uploads/2011/04/Viscosity.pdf>. [Acedido: 25-Fev-2018].
- [81] «Carbonic Anhydrase - Assay». [Em linha]. Disponível em: <http://www.worthington-biochem.com/ca/assay.html>. [Acedido: 25-Fev-2018].
- [82] C. Prabhu, S. Wanjari, S. Gawande, S. Das, N. Labhsetwar, S. Kotwal, A. K. Puri, T. Satyanarayana, e S. Rayalu, «Immobilization of carbonic anhydrase enriched microorganism on biopolymer based materials», *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 60, n. 1–2, pp. 13–21, 2009.
- [83] J. L. Kaar, H.-I. Oh, A. J. Russell, e W. J. Federspiel, «Towards improved artificial lungs through biocatalysis.», *Biomaterials*, vol. 28, n. 20, pp. 3131–9, Jul. 2007.
- [84] D. Yue, Y. Jia, Y. Yao, J. Sun, e Y. Jing, «Structure and electrochemical behavior of ionic liquid analogue based on choline chloride and urea», *Electrochim. Acta*, vol. 65, n. 30, pp. 30–36, 2012.
- [85] C. Du, B. Zhao, X.-B. Chen, N. Birbilis, e H. Yang, «Effect of water presence on choline chloride-2urea ionic liquid and coating platings from the hydrated ionic liquid», *Sci. Rep.*, vol. 6, n. 1, p. 29225, 2016.
- [86] Z. Huang, B. Jiang, H. Yang, B. Wang, N. Zhang, H. Dou, G. Wei, Y. Sun, e L. Zhang, «Investigation of glycerol-derived binary and ternary systems in CO₂ capture process», *Fuel*, vol. 210, n. August, pp. 836–843, 2017.
- [87] Y. Dai, J. van Spronsen, G. J. Witkamp, R. Verpoorte, e Y. H. Choi, «Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology», *Anal. Chim. Acta*, vol. 766, pp. 61–68, 2013.
- [88] K. Mulia, S. Putri, E. Krisanti, e Nasruddin, «Natural deep eutectic solvents (NADES) as green solvents for carbon dioxide capture», 2017, vol. 20022, p. 20022.
- [89] J.-C. Park, T. Ito, K.-O. Kim, K.-W. Kim, B.-S. Kim, M.-S. Khil, H.-Y. Kim, e I.-S. Kim, «Electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers: effects of degree of hydrolysis and enhanced water stability», *Polym. J.*, vol. 42, pp. 273–276, 2010.
- [90] M. Martins, I. M. Aroso, R. L. Reis, A. R. C. Duarte, R. Craveiro, e A. Paiva, «Enhanced performance of supercritical fluid foaming of natural-based polymers by deep eutectic solvents», *AIChE J.*, vol. 60, n. 11, pp. 3701–3706, Nov. 2014.
- [91] E. Ozdemir, «Biomimetic CO₂ Sequestration: 1. Immobilization of Carbonic Anhydrase within Polyurethane Foam», *Energy & Fuels*, vol. 23, n. 11, pp. 5725–5730, 2009.

7 ANEXOS

ANEXO I

Protocolo da Atividade Enzimática da Anidrase Carbónica

Enzima Livre

Inicialmente, o eléctrodo de pH utilizado foi calibrado, para temperaturas entre os 0 e os 4 °C.

- Reagentes:
 - Tampão 0.02 M Tris-HCl, pH = 8.0. Guardado em banho de gelo a 0-4 °C antes e durante a utilização no ensaio.
 - Água saturada em CO₂. Borbulhar CO₂ em água desionizada gelada durante cerca de 30 minutos e colocar um balão enchido com CO₂ na superfície do balão. Durante o processo de saturação, conservar a água em banho de gelo a 0-4 °C.
 - Solução de enzima com uma concentração de 0.1 mg/ml do pó liofilizado em água gelada. Conservar a solução em banho de gelo.
- Procedimento

Determinação do branco: Adicionar 3 mL de tampão 0.02 M Tris-HCl, pH 8.0 num falcon e adicionar a este 50 µL de água fria. Manter a temperatura a 0 – 4º C e medir pH.

Retirar com uma seringa de 2 mL de água saturada de CO₂ refrigerada e adicionar ao tampão Tris. Iniciar imediatamente a contagem e registar o tempo necessário para que o pH diminua de 8.3 para 6.3. Registar este tempo como T₀.

Determinação da actividade da enzima: Adicionar 3 mL de tampão 0.02 M Tris-HCl, pH 8.0 num frasco tipo falcon. Manter a temperatura a 0 – 4º C e medir o pH. Adicionar 50 µL de enzima diluída. Rapidamente adicionar 2 mL de água saturada de CO₂ e registar o tempo necessário para que o pH diminua de 8.3 para 6.3. Registar este tempo como T.

Cálculo da atividade:

$$\circ \text{ Unidades/mg} = 2 \times \frac{(T_0 - T)}{T \times \text{mg enzima na mistura da reação}}$$

Em DES

Todo o procedimento é igual ao anteriormente descrito, mas ao invés de ser utilizado apenas tampão Tris-HCl, foi utilizada uma mistura de tampão com DES. Esta mistura tem uma concentração de 0.5% (v/v) ChCl:Ureia (1:2), sendo esta a concentração utilizada nas fibras.

Na fibra

O procedimento utilizado para o estudo da atividade enzimática da anidrase carbônica presente na fibra, é igual ao descrito para a enzima livre, utilizando uma pequena amostra de fibra 9% PVA + 0.5%ChCl:Ureia + 0.5 mg enzima com um peso aproximado de 10 mg, em vez da utilização da solução enzimática.